



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA

ACTIVACIÓN DEL EJE TWEAK/FN14 DURANTE EL

REMODELADO VASCULAR:

MECANISMOS MOLECULARES Y MODULACIÓN

TERAPÉUTICA.

M^a VALVANERA FERNÁNDEZ LASO

Madrid, 2016

DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA

FACULTAD DE MEDICINA

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

ACTIVACIÓN DEL EJE TWEAK/FN14 DURANTE EL REMODELADO

VASCULAR:

MECANISMOS MOLECULARES Y MODULACIÓN TERAPÉUTICA.

Memoria que presenta la licenciada en biología M^a Valvanera Fernández Laso
para optar al grado de Doctor por la Universidad Autónoma de Madrid

Directores de tesis:

Dr. Luis M. Blanco y Dr. Jesús Egido de los Ríos

Instituto de Investigaciones Sanitarias-Fundación Jiménez Díaz,

Universidad Autónoma de Madrid.

RESUMEN

El remodelado vascular es un proceso adaptativo, esencial en las enfermedades arteriales, que implica cambios estructurales de la pared vascular. En determinadas circunstancias, se puede producir una cronificación de esta respuesta dando lugar a un remodelado patológico. Tanto el remodelado fisiológico como el patológico están mediados por una compleja red de tipos celulares y moléculas que continua sin identificarse completamente en la actualidad. Entre estas moléculas se encuentra la citoquina proinflamatoria TWEAK y su receptor Fn14. En la presente tesis analizamos el papel que desempeña el eje TWEAK/Fn14 en dos patologías en las que interviene el remodelado vascular patológico, como son el Aneurisma de Aorta Abdominal (AAA) y la Aterosclerosis acelerada por diabetes.

El remodelado vascular contribuye a la dilatación de la aorta que tiene lugar durante el desarrollo del AAA. Para analizar el papel que desempeña el eje TWEAK/Fn14, realizamos un modelo de perfusión de elastasa en las aortas de ratones salvajes (WT) y deficientes para TWEAK (TWEAK KO) o Fn14 (Fn14 KO). La deficiencia de TWEAK o Fn14 redujo la expansión aortica, la infiltración de leucocitos, la neoangiogénesis, y la expresión de citoquinas proinflamatorias tras 14 post-perfusión. También disminuyó la pérdida de células del musculo liso vascular (CMLV), debido a una menor apoptosis en los ratones deficientes comparado con los controles. Además, los ratones WT presentaron una mayor disrupción de las capas elásticas, así como una actividad MMP aumentada. Experimentos *in vitro* demostraron que TWEAK indujo la secreción de CCL5 y la activación de MMP-9 tanto en CMLV como en macrófagos derivados de medula ósea (BMDM) y disminuyó la viabilidad de las CMLV.

Por otro lado, la diabetes es uno de los principales factores de riesgo cardiovascular. Sin embargo, el papel de TWEAK sobre el desarrollo de la lesión aterosclerótica en condiciones de hiperglucemia se desconoce. Para evaluarlo, utilizamos dos abordajes experimentales complementarios: la delección génica de TWEAK y el tratamiento con un anticuerpo bloqueante anti-TWEAK. La inhibición de TWEAK redujo la extensión y severidad de las lesiones ateroscleróticas en el ratón diabético, presentando placas más estables, caracterizadas por un menor contenido lipídico y macrofágico. Además, comprobamos tanto en las placas de los ratones ApoE como en CMLV en cultivo en condiciones de hiperglucemia, que la activación de STAT1 y la consecuente expresión de algunos de sus genes proinflamatorios diana (CCL5, CXCL10 and ICAM-1) mediaba, al menos en parte, los efectos proaterogénicos de TWEAK. También demostramos que TWEAK induce la expresión de RNAm de estos genes proinflamatorios a través de su receptor Fn14 y mediante la activación de STAT1 en CMLV en cultivo.

En conclusión, el eje TWEAK/ Fn14 participa en el remodelado vascular patológico implicado tanto en la formación del AAA como en la aceleración de la aterosclerosis en condiciones de hiperglucemia. La inhibición terapéutica del eje TWEAK/Fn14 podría tener un efecto protector en patologías que implican remodelado vascular no adaptativo.

SUMMARY

Vascular remodelling is an adaptative process essential in arterial illnesses that involves structural changes in the vascular wall. However, in some circumstances, inappropriate tissue responses occur resulting in maladaptive tissue remodeling. Physiological and pathological tissue remodeling are mediated by a complex network of cell types and molecular players which are still being unraveled, among them, the cytokine TWEAK and its receptor Fn14. In this thesis we have analyzed the role that TWEAK/Fn14 axis in two pathologies that implies vascular remodelling such as abdominal aortic aneurysm (AAA) and diabetic-accelerated atherosclerosis.

Vascular remodelling contributes to aortic dilatation during AAA formation. To analyze whether TWEAK/Fn14 axis are involved in AAA development, a experimental AAA model with aortic elastase perfusion in mice was induced in wild-type (WT), TWEAK deficient (TWEAK KO), or Fn14-deficient (Fn14 KO) mice. TWEAK or Fn14 deficiency reduced aortic expansion, leukocytes infiltration, angiogenesis, chemokines expression, and MMP activity after 14 days postperfusion. TWEAK and Fn14 KO mice also showed a reduced loss of medial vascular smooth muscle cells (VSMC) that was related to a reduced number of apoptotic cells when compared with WT mice. Aortas from WT animals present a higher disruption of the elastic layer and MMP activity, indicating a diminished vascular remodeling in KO animals. In vitro experiments unveiled that TWEAK induces CCL5 secretion and MMP-9 activation in both VSMC and bone marrow-derived macrophages, and decrease VSMC viability, effects dependent on Fn14.

In the other hand, diabetes is a key cardiovascular risk factor but the role of TWEAK/Fn14 axis under hyperglycemic conditions is unknown. Using two different approaches, genetic deletion of TWEAK and treatment with a TWEAK blocking mAb, we have analyzed the effect of TWEAK inhibition on atherosclerotic plaque progression and stability in streptozotocin-induced diabetic ApoE deficient mice. Genetic inactivation of TWEAK reduced atherosclerosis extension and severity in diabetic ApoE deficient mice. TWEAK deficient mice display a more stable plaque phenotype characterized by lower lipid and macrophage content within atherosclerotic plaques. A similar phenotype was observed in diabetic mice treated with anti-TWEAK mAb. The proatherosclerotic effects of TWEAK were mediated, at least in part, by STAT1 activation and expression of proinflammatory target genes (CCL5, CXCL10 and ICAM-1), both in plaques of ApoE mice and in cultured vascular smooth muscle cells (VSMCs) under hyperglycemic conditions. Loss-of-function experiments demonstrated that TWEAK induces proinflammatory genes mRNA expression through its receptor Fn14 and STAT1 activation in cultured VSMCs.

In conclusion, TWEAK/Fn14 axis contribute to the pathological remodelling during AAA formation, and atherosclerosis progression under hyperglucemia conditions. Therapeutical inhibition of TWEAK could have a protective effect on pathologies that implies vascular remodelling.

ÍNDICE

ÍNDICE.....	11
CLAVE DE ABREVIATURAS	15
I.INTRODUCCIÓN	21
1. Remodelado Vascular.....	23
1.1 El Aneurisma de Aorta Abdominal.	25
1.2 La Aterosclerosis.....	28
1.1.1 Patogenia de la aterosclerosis.....	28
1.1.2 Factores de Riesgo	32
1.1.2.1 Diabetes.....	32
2. La Superfamilia del Factor de Necrosis Tumoral.....	34
2.1. TWEAK y Fn14.	35
3. Señalización a través del sistema TWEAK-Fn14.	37
3.1. Señalización a través del factor de transcripción NF- κ B	39
3.2. Señalización a través de la ruta JAK/STAT.....	41
4. Papel de TWEAK y Fn14 en el AAA y la aterosclerosis	43
II.HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	47
III.MATERIALES Y MÉTODOS.....	51
1. Muestras de AAA humanas	53
2. Cultivos Celulares	53
2.1. Cultivos primarios.....	53
2.2. Ensayos de viabilidad	54
2.3. Zimografía.....	54
3. Modelos Animales.....	55
3.1. Modelo de AAA por perfusión de elastasa.....	55
3.2. Modelo de Aterosclerosis acelerada por diabetes.....	56
4. Análisis Histológicos	57
4.1. Tinción de aorta completa.	57
4.2. Análisis morfométrico del seno aórtico, la arteria braquiocefálica y el AAA.....	58
4.3. Análisis inmunohistoquímico.	59
4.4. Análisis morfométrico de las inmunohistoquímicas.	62
4.5. SouthWestern.	62
5. Análisis de ARN: Extracción de ARN y PCR en tiempo real.	62
6. Análisis de proteínas.	63
6.1. Western blot.....	63

6.2. ELISA.	64
7. Transfección con ARN pequeño de interferencia.....	64
8. Tomografía de fluorescencia molecular	64
9. Estadística	65
IV.RESULTADOS	66
1. La deficiencia de TWEAK o Fn14, reduce el AAA inducido por elastasa en ratones.	68
1.1. TWEAK y Fn14 se expresan en el AAA de humanos	68
1.2. La deficiencia de TWEAK o Fn14 protege del AAA inducido por perfusión con elastasa en ratón.	69
1.3. La deficiencia de TWEAK o Fn14 reduce el contenido inflamatorio de la lesión en el AAA... ..	71
1.4. La deficiencia de TWEAK o Fn14 reduce la apoptosis de células vasculares.....	75
1.5. El eje TWEAK/Fn14 participa en la degradación de la elastina en el AAA experimental	79
2. El bloqueo de TWEAK disminuye el tamaño y la progresión de la lesión aterosclerótica debido a la supresión de la vía de señalización de STAT en los ratones diabéticos.....	83
2.1 La deficiencia de TWEAK reduce la carga aterosclerótica y el tamaño de la placa en el ratón ApoE diabético.....	83
2.2 La deficiencia de TWEAK disminuye la progresión de la placa en el ratón diabético ApoE. ...	86
2.3 La deficiencia de TWEAK reduce la respuesta proinflamatoria inducida por STAT1 en un contexto de hiperglucemia.....	89
2.4 El tratamiento con un anticuerpo anti-TWEAK reduce la carga aterosclerótica, así como su tamaño y progresión en los ratones deficientes para ApoE diabéticos.	92
V.DISCUSIÓN.....	98
1. La deficiencia de TWEAK o Fn14, reduce el AAA inducido por elastasa en ratones.	101
2. El bloqueo de TWEAK disminuye el tamaño y la progresión de la lesión aterosclerótica debido a la supresión de la vía de señalización de STAT en los ratones diabéticos.....	106
VI.CONCLUSIONES	114
VII.BIBLIOGRAFIA.....	118
VIII.ANEXOS	136
Publicaciones derivadas de la tesis	138
Otras publicaciones realizadas durante el desarrollo de la tesis	140

CLAVE DE ABREVIATURAS

A continuación, se detallan todos los acrónimos utilizados a lo largo de la tesis. En la mayoría se ha conservado la nomenclatura correspondiente en inglés debido a su frecuente utilización en el lenguaje científico, en cuyo caso aparece la explicación en inglés en primer lugar (en cursiva), y en segundo lugar la explicación en castellano.

AAA: Aneurisma de Aorta Abdominal.

ADN: Ácido desoxiribonucleico.

AEC: sustrato cromogénico 3-amino-9-ethylcarbazole

AGE: *Advanced Glycation End products*; Productos de Glicosilación Avanzada

AngII: Angiotensina II

ApoE: Apolipoproteína E.

ApoB: Apolipoproteína B

ApoB: Apolipoproteína B100

ARNm: Ácido Ribonucleico mensajero.

Arg: Arginina

BCA: Ácido bicinconínico

BMDM: *Bone Marrow derived Macrophages*; Macrófagos derivados de Médula Ósea.

CCL: Ligando de quimioquina con motivo CC

CMLV: Células del músculo liso vascular.

Cys: Cisteína

DAB: Tetraclorhidrato de 3,3'-diaminobenzidina

DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol

DE: Desviación Estandar

DKO: *Double Knock Out*; Doble deficiente.

DPX: Resina acrílica con base de xileno

ECL: *Enhanced chemiluminescence*, Sistema de quimioluminiscencia.

EEM: Error estándar de la media

EGF: Factor de Crecimiento Epidérmico

ELISA: *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*; ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas

ERK: *Extracellular Regulated Kinase* / quinasa regulada extracelularmente.

FGF: Factor de Crecimiento de Fibroblastos.

Fn-14: *Fibroblast growth factor-inducible 14* / factor inducible de crecimiento de fibroblastos-14.

GAS: Secuencia activada gamma

GM-CSF: *Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor* / factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos.

HDL: *High Density Lipoprotein* / lipoproteína de alta densidad.

HRP: Peroxidasa de rábano

HUVEC: *Human Umbilical Vein Endothelial Cells* / células endoteliales procedentes de vena de cordón umbilical humano.

ICAM: *Intercellular Adhesion Molecule* / molécula de adhesión intercelular.

IgG: Inmunoglobulina G.

I κ B: Inhibidor de kappa B.

IKK: I κ B quinasa.

IL: Interleuquina.

INF- γ : Interferón gamma.

ISRE: Elemento de Respuesta Estimulado por INF.

JAK: Janus quinasa.

JNK: c-Jun N-terminal Kinase / quinasa n-terminal de Jun.

KO: *Knockout* / deficiente para un gen.

LDL: *Low Density lipoprotein* / lipoproteína de baja densidad.

LDLox: *oxidated Low Density Lipoprotein* / lipoproteína de baja densidad oxidadas.

LDLR: Receptor de Lipoproteínas de Baja Densidad.

MAPK: *Mitogen-Activated Protein Kinases*; proteína quinasas activadas por mitógenos.

MCP-1: *Monocyte Chemotactic Protein-1* / proteína quimiotáctica para monocitos.

MMP: *Matrix Metalloproteinase* / metaloproteinasa de matriz.

NF κ B: *Nuclear Factor Kappa B* / factor nuclear kappa B.

NO: Oxido Nitrico.

OCT: *Optimal cutting temperature compound* / Compuesto de temperatura de corte optima.

OMS: Organización Mundial de la Salud

PBS: *Phosphate Buffered Saline* / tampón fosfato salino.

PCR: *Polymerase Chain Reaction* / reacción en cadena de la polimerasa.

PDGF: *Platelet-Derived Growth Factor* / factor de crecimiento derivado de plaquetas.

PI3K: *Phosphatidylinositol-3-Kinase* / fosfoinositol 3-quinasa.

PKC Proteína quinasa C

PMA: *Phorbol Myristate Acetate* / forbol miristato acetate.

PVDF: Fluoruro de polivinilideno

RANTES: *Regulated on Activation, Normal T cell Expressed and Secreted*.

RAS: Sistema Renina Angiotensina

RESAA:

ROS: Reactive Oxygen Species / especies reactivas de oxígeno.

RT-PCR: *Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction* / reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa

Ser: Serina

SFB: Suero Fetal Bovino.

SH2 Dominio de homología Src-2

siARN: ARN pequeño de interferencia

SLN: señal de localización nuclear.

STAT: Transductor de la señal y activador de la transcripción

STZ: Estreptozotocina

TAA: Aneurisma de Aorta Toracica

TBS: Tampón Tris Salino

TdT: *Terminal deoxynucleotidyl Transferase* / desoxinucleotidiltransferasa terminal.

TGFβ: *Transforming Growth Factor beta 1* / factor de crecimiento transformante 1.

TNF: *Tumoral Necrosis Factor* / factor de necrosis tumoral.

TNFR: *Tumoral Necrosis Factor Receptor* / receptor del factor de necrosis tumoral.

TNFSFR: *Tumor Necrosis Factor Superfamily Receptor* / receptor de la superfamilia del factor de necrosis tumoral.

TNFα: *Tumoral Necrosis Factor α* / factor de necrosis tumoral alfa.

TRAF: *TNF Receptor Associated Factor* / factor asociado al receptor de TNF.

TUNEL: *Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling*.

TWEAK: *Tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis* / factor inductor débil de apoptosis similar al factor de necrosis tumoral.

Tyr: Tirosina

UDA: Unidades Densitométricas Arbitrarias

UI: Unidades de Insulina

VCAM: *Vascular Cell Adhesion Molecule* / molécula de adhesión celular vascular.

VEGF-A: *Vascular Endothelial Growth Factor A* / factor de crecimiento de endotelio vascular A.

VLDL: *Very Low Density Lipoprotein* / lipoproteína de muy baja densidad

I.INTRODUCCIÓN

1. Remodelado Vascular

En 1987, Glagov et al. publicaron un hallazgo sorprendente, durante la enfermedad aterosclerótica, no sólo se producía un crecimiento de la lesión aterosclerótica hacia la luz arterial, sino que las arterias estaban sometidas a otros muchos cambios como el crecimiento expansivo, aumentando así su diámetro para preservar el flujo sanguíneo (1). Esta capacidad de remodelado de las arterias es un proceso adaptativo, esencial en las enfermedades arteriales. En la actualidad, se denomina *remodelado vascular* a las alteraciones persistentes en la estructura y composición de los vasos sanguíneos. El remodelado vascular es un proceso activo en el que se producen cambios estructurales de la pared vascular que implican: crecimiento, muerte, proliferación y migración celular, así como la producción o degradación de matriz extracelular. Todos estos procesos están regulados por la interacción dinámica de factores de crecimiento, sustancias vasoactivas y estímulos hemodinámicos. El remodelado, a pesar de ser un proceso adaptativo en respuesta a cambios a largo plazo en las condiciones hemodinámicas, puede contribuir a la fisiopatología de enfermedades vasculares y a desordenes circulatorios (2). Puede ser hipertrófico o hipotrófico y el crecimiento de la pared arterial puede darse hacia fuera o hacia el lumen. El remodelado vascular es característico de ciertas patologías cardiovasculares como son la hipertensión, la aterosclerosis, el aneurisma o la restenosis. (**Figura 1**).

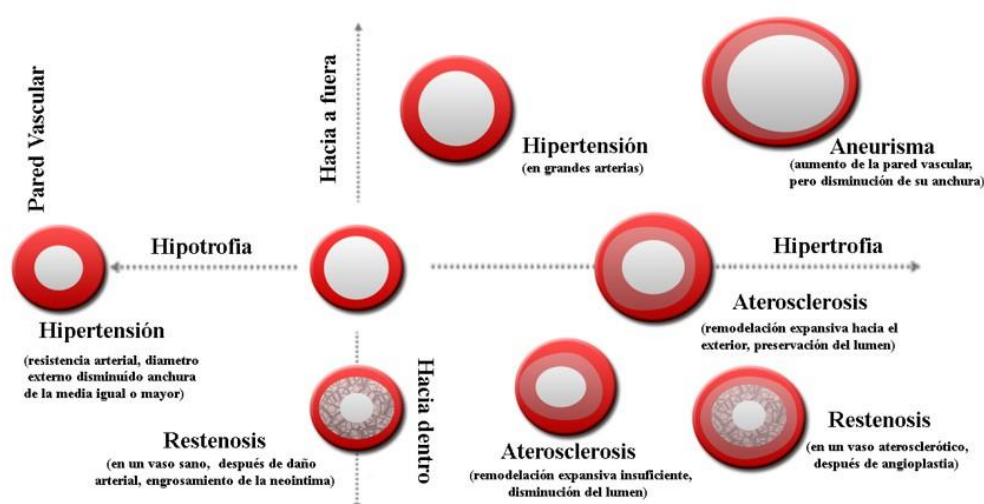


Figura 1. Representación esquemática del remodelado vascular que ocurre en distintas patologías.
Modificado de (3)

Las enfermedades cardiovasculares son la primera causa de muerte no solo en los países occidentales sino también en los países en vías de desarrollo (4). En esta tesis estudiaremos dos patologías vasculares que implican remodelado, la aterosclerosis y el aneurisma de aorta abdominal (AAA).

Las arterias sanas están formadas por tres capas concéntricas (**Figura 2**):

- *Capa íntima*: Compuesta por una capa de células endoteliales que reviste la superficie interna del vaso y una membrana limitante elástica interna, que la separa de la media. El endotelio se apoya en la capa subendotelial, constituida por tejido conjuntivo que puede presentar CMLV de manera dispersa. La membrana elástica es tubular y perforada, permitiendo la difusión de los metabolitos que nutren las células de la pared arterial.
- *Capa media*: Formada principalmente por CMLV dispuestas circularmente a las que se agregan cantidades variables de elastina, colágeno y proteoglicanos. Las CMLV son células metabólicamente muy activas y responsables de la síntesis de la matriz extracelular. La media posee una lámina elástica externa que la separa de la capa adventicia.
- *Capa adventicia*: Consta principalmente de fibras de colágeno y elastina. Esta capa continúa con el tejido conjuntivo y adiposo que envuelve los *vasa vasorum*, los cuales desempeñan una función principalmente estructural y nutritiva.

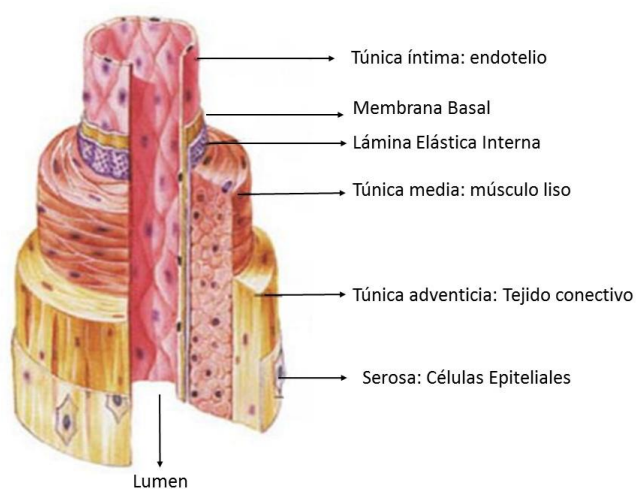


Figura 2. Esquema representativo de la estructura y capas de la pared arterial.

1.1 El Aneurisma de Aorta Abdominal.

El aneurisma de aorta abdominal (AAA) es una dilatación permanente y localizada del diámetro de la aorta igual o superior a 3cm. Los AAA son normalmente asintomáticos por lo que el mayor peligro es que permanece oculto y sin tratamiento hasta que su progresiva expansión desencadena en rotura de la pared arterial, hemorragia y muerte. Sin tratamiento, un AAA se debilita siendo incapaz de aguantar la presión sanguínea lo que induce su dilatación progresiva y posterior rotura, dando lugar a un riesgo de mortalidad asociada de un 50 a un 80%. De hecho, el AAA es una de las principales causa de muerte a partir de la sexta década de vida (5).Ademas, debido al hecho de que los AAA pequeños son clínicamente silenciosos, el acceso a muestras de este tipo de tejidos está muy limitado (6,7) por lo que el conocimiento de cómo se inicia este proceso es prácticamente inexistente y lo que conocemos, se basa en la extrapolación de datos procedentes de modelos animales, desconociéndose el poder traslacional de estos modelos en el contexto humano. Como consecuencia la etiología de la enfermedad aneurismática sigue siendo un enigma en la actualidad (8).

La aorta se puede subdividir en sus componentes torácico y abdominal. La aorta torácica se puede clasificar a su vez, en la aorta ascendente, el arco aórtico y la aorta torácica descendente, mientras que la aorta abdominal se extiende desde el diafragma hasta la bifurcación aórtica. Los aneurismas se pueden desarrollar tanto en la aorta torácica (TAA) como en la abdominal, siendo estos últimos más frecuentes (9,10) y en su mayoría localizados en la zona infra-renal (11) (**Figura 3**). Históricamente se pensaba que tanto los TAA como los AAA tenían su origen en la degeneración aterosclerótica de la pared aórtica. Sin embargo, estudios recientes han demostrado que estas patologías son entidades distintas (12).

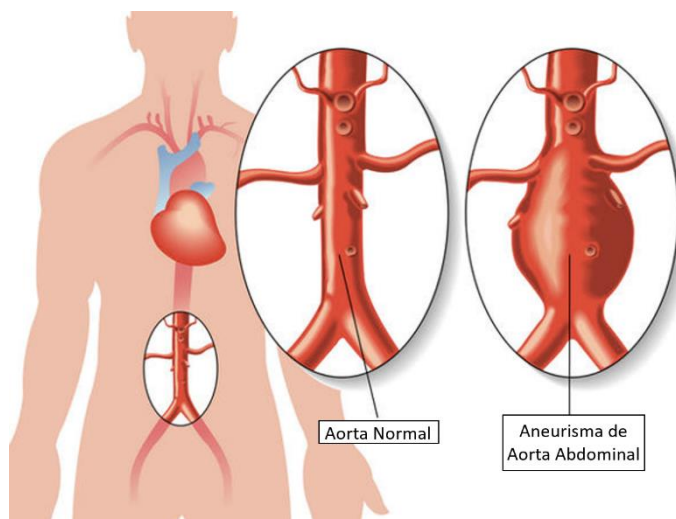


Figura 3: Representación esquemática de la localización y dilatación de la aorta en el AAA.

El AAA es una enfermedad multifactorial compleja, con un fuerte componente genético (13–16). Sin embargo, existen otros factores de riesgo en el desarrollo de esta patología, siendo el primero y más influyente el tabaquismo. Además, se ha comprobado que esta enfermedad se da principalmente en etapas tardías de la vida y principalmente en varones (14). Se han identificado varios procesos biológicos que contribuyen a la patogénesis del AAA. A nivel histológico, los marcadores de esta enfermedad incluyen: la inflamación, la apoptosis de CMLV, la degradación de la matriz extracelular y el estrés oxidativo. (17). Una de las principales diferencias entre la pared aórtica aneurismática y la sana es la pérdida de CMLV y el aumento del contenido inflamatorio (18,19).

El estado inicial de esta patología se caracteriza por la fragmentación de las fibras elásticas de la pared vascular que depende principalmente de la producción de proteasas como las MMPs (MMP-2, MMP-3, MMP-9, MMP-13, MMP-14, MMP-19) por las CMLV residentes y por las células inmunes (20,21). A continuación, y en respuesta a la degradación de la elastina y a la expresión de citoquinas proinflamatorias por las células residentes de la pared arterial, se produce un incremento de la infiltración de leucocitos. Esta inflamación local, favorece la intensificación de la producción de enzimas proteolíticas que favorecerá la degradación de la matriz extracelular (21). Acompañando este proceso, se produce una disminución en el número de CMLV por apoptosis o muerte celular programada, lo que contribuye a la degeneración del AAA (21,22). Durante la progresión del AAA puede producirse un trombo intramural lo que complicaría aún más la evolución del AAA (21). Todos estos

cambios estructurales derivan en un colapso de la integridad de la pared arterial y en su rotura, cuando la pared arterial ya no es capaz de soportar la presión sanguínea (23).

Actualmente no hay unas recomendaciones claras en relación al tratamiento farmacológico para prevenir la progresión de los AAA o para reducir el riesgo de rotura de los mismos (24,25). Los tratamientos actuales implican cirugía de reparación, tanto cirugía abierta como endovascular (24), que se recomienda cuando el diámetro luminal es mayor de 5 cm (26,27). Por este motivo es de vital importancia llevar a cabo estudios celulares y moleculares para desarrollar nuevas terapias para el tratamiento del AAA. Para ello, una de las principales fuentes de conocimiento siguen siendo los modelos animales. En este sentido el aneurisma aórtico en ratones puede inducirse mediante tres estrategias diferentes: por perfusión de elastasa, mediante la aplicación de CaCl_2 o por infusión de angiotensina II (Ang II) (28). En el modelo de infusión de elastasa se aísla la aorta abdominal y se perfunde con elastasa en el lumen durante un breve periodo de tiempo (5 min) provocando la degradación de la elastina y la subsiguiente dilatación de la aorta al cabo de unos 14 días. De forma similar a lo que se observa histológicamente en humanos, aparece una respuesta inflamatoria crónica en la pared aórtica. En el segundo modelo, se aplica CaCl_2 de forma periarterial por lo que ésta técnica es menos invasiva y exigente que el modelo de elastasa (29). Al igual que en el modelo de elastasa, los ratones desarrollan los aneurismas de forma gradual, con un incremento del 100% del diámetro de la aorta a las 3 semanas de la intervención y caracterizándose este AAA por la presencia de una respuesta inflamatoria crónica. En el tercer modelo, se infunde AngII biológicamente activa a ratones hiperlipidémicos, deficientes para ApoE o para el receptor de LDL (LDLR) mediante una mini-bomba osmótica subcutánea, durante unas 4 semanas. Este modelo, replica la acción del Sistema Renina-Angiotensina (RAS). En este caso, el aneurisma se desarrolla en la región suprarrenal, y la histología de estos aneurismas es diferente a la observada en humanos, con una elastina más preservada. Aún así, es el método más utilizado, ya que no es necesario practicar cirugía a los animales.

1.2 La Aterosclerosis

Clásicamente, la aterosclerosis se consideraba una enfermedad provocada por la acumulación de lípidos en la pared vascular. Sin embargo, a día de hoy, entendemos la aterosclerosis como un desorden inflamatorio crónico que afecta mayoritariamente a las arterias de gran calibre. Esta patología, se caracteriza por la formación en la pared del vaso de una lesión o placa de ateroma, constituida por acumulación de lípidos y leucocitos infiltrantes y una capa formada mayoritariamente por colágeno y producida por las células de músculo liso vascular (CMLV) (30).

1.1.1 Patogenia de la aterosclerosis.

La aterosclerosis es un proceso complejo que empieza a desarrollarse en la juventud, progresando de forma asintomática hasta la edad adulta (31) y que implica múltiples procesos como disfunción endotelial, inflamación, proliferación vascular, neovascularización, estrés oxidativo, apoptosis, degradación de la matriz extracelular y trombosis (32).

En la actualidad, se considera que la disfunción endotelial es uno de los primeros eventos de la aterogénesis. La pérdida de un adecuado funcionamiento del endotelio, que regula la interacción de las células y proteínas circulantes con las células residentes de la pared vascular, afecta a la homeostasis vascular, promoviendo de este modo el inicio de la formación de la lesión aterosclerótica. La activación del endotelio parece estar relacionada con la disminución de la disponibilidad de óxido nítrico (NO) secundaria a la presencia de diversos factores de riesgo cardiovascular como la hipertensión, la dislipidemia, la diabetes, o el tabaquismo (33–37).

Las lipoproteínas de baja densidad (LDL) son uno de los factores de riesgo cardiovascular claves, ya que aprovechan las pequeñas alteraciones en la capa endotelial para entrar y acumularse en el espacio subendotelial. Debido al aumento de la concentración plasmática de las LDL, el tiempo de residencia en el espacio subendotelial puede verse incrementado, aumentando así la probabilidad de oxidación a cargo de los radicales libres de oxígeno (ROS) producidos por el endotelio adyacente, las CMLV y/o los macrófagos. Es así como se generan las LDL oxidadas (LDLox), que pueden activar al endotelio y estimular la expresión de moléculas de adhesión celular y de sustancias quimiotácticas como la proteína quimiotáctica para monocitos (MCP-1), la molécula de adhesión vascular 1 (VCAM-1), la

molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM-1) y la E-selectina, favoreciendo la unión de los leucocitos circulantes a la superficie endotelial y su infiltración en la capa íntima vascular, donde se diferencian y se activan (38,39). La mayoría de los monocitos atraídos a la zona de la lesión se diferencian a macrófagos o a células dendríticas por efecto del factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF)(40). Los macrófagos activados liberan mediadores y expresan niveles elevados de receptores basureros o *scavenger* (CD204 y CD36, principalmente) encargados de la captación de LDLox, transformándose así en células espumosas cargadas de lípidos (41). La acumulación de estas células da lugar a la formación de la estría grasa (42,43).

Por otro lado, los monocitos y las células endoteliales liberan factores mitogénicos que estimulan la migración, proliferación y síntesis de matriz extracelular por parte de las CMLV. Además, las CMLV activadas y las células espumosas secretan gran cantidad de mediadores proinflamatorios que aceleran el reclutamiento de un número mayor de leucocitos, generándose un bucle de inflamación crónica en el lugar de la lesión, que agrava el proceso aterosclerótico. Todo ello da lugar a que la lesión progrese hacia una placa madura. La ingesta continuada de LDLox por las células espumosas provoca finalmente la necrosis de las mismas, vertiendo su contenido lipídico al medio extracelular y dando como resultado la formación de un núcleo lipídico avascular con bajo número de células, recubierto por una matriz extracelular rica en colágeno, elastina y CMLV, denominada cápsula fibrosa. Además, se produce un cambio de fenotipo de las CMLV de contráctil a secretor.

Los macrófagos, además de su papel en la respuesta inflamatoria, produciendo gran cantidad de citoquinas proinflamatorias y quimioquinas que por un lado atraen a más leucocitos circulantes y por otro inducen el remodelado vascular por las CMLV, son células clave en la progresión de la aterosclerosis, ya que influyen en la estabilidad de la placa, bien provocando una disminución en la síntesis de proteínas de matriz extracelular (colágeno, fibronectina, elastina y laminina), bien favoreciendo su degradación mediante la expresión incrementada de las metaloproteinasas (MMP) (44). Este desequilibrio entre síntesis y degradación de colágeno debilita la placa y la hace vulnerable y propensa a la rotura. De hecho, varios estudios han mostrado una correlación significativa entre la presencia de macrófagos en regiones del hombro de las placas propensas a la rotura, el estrechamiento de

la cápsula fibrosa en estas regiones y la acumulación de metaloproteinadas (MMP) activadas (44,45).

Las placas fibro-ateromatosas evolucionan hacia lesiones cada vez más complicadas y heterogéneas, caracterizadas por la presencia de calcificaciones, y un núcleo necrótico, lipídico y hemorrágico. Los vasos sanos se nutren a través de la difusión de oxígeno del lumen a los vasos o del *vasa vasorum* adventicial. Sin embargo, cuando la pared del vaso excede la distancia efectiva de difusión del oxígeno, proliferan los *vasa vasorum* en las capas internas de la pared del vaso. Esta neoangiogénesis y aparición de la hemorragia intraplaca, son determinantes en la aparición de eventos clínicos ya que la sangre provee a la placa de un ambiente pro-oxidativo, pro-inflamatorio y proteolítico que promueve la vulnerabilidad de la cápsula fibrosa. (46)

Las consecuencias clínicas más significativas ocurren cuando la cápsula fibrosa se rompe y el núcleo trombogénico del interior de la lesión entra en contacto con las proteínas coagulantes de la sangre circulante, formándose un trombo que, al ser liberado, puede dar lugar a diferentes efectos patológicos como infarto de miocardio, ictus cerebral o tromboembolismo venoso (47) (**Figura 4**).

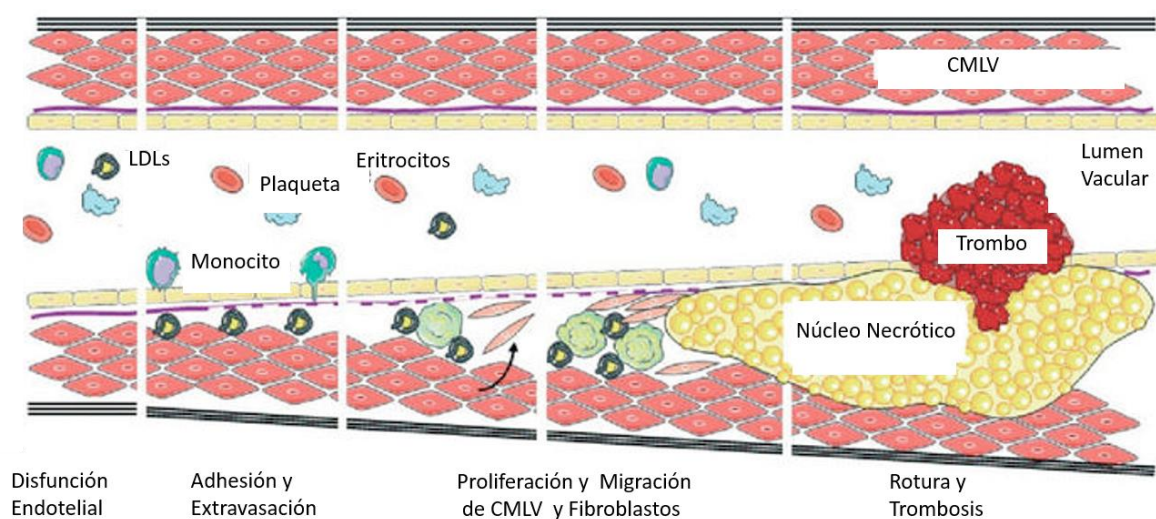


Figura 4: Representación esquemática de la formación de la placa aterosclerótica y su evolución en el tiempo.

Para estudiar la aterosclerosis hay varios modelos animales disponibles. El modelo de ratones deficientes para el receptor de LDL, es un modelo de hipercolesterolemia familiar, causada por una mutación que afecta a el LDLR confiriéndole un perfil lipoproteico del plasma similar al de humanos. Los ratones deficientes para LDLR manifiestan un aclaramiento lento de VLDL y LDL del plasma, lo que deriva en un incremento moderado de los niveles plasmáticos de colesterol y un lento desarrollo de aterosclerosis con una dieta estándar(48,49) que pueden acelerarse mediante dieta en grasa o rica en colesterol (48–50), mutando el gen ApoB (51) o cruzándolos con ratones deficientes para leptina (52), o con ratones transgénicos para ApoB100 (53). En estas condiciones las lesiones ateroscleróticas que se generan en el animal pueden progresar desde un estado de estría grasa formada por células espumosas hasta un estado fibroproliferativo.

El primer modelo en el que se describieron lesiones similares a las de humanos, es el modelo del ratón deficiente para la Apolipoproteína E (ApoE). Estos ratones tienen un incremento notable de los niveles plasmáticos de LDL y VLDL debido al fallo en el aclaramiento a través de LDLR y de sus proteínas asociadas. Con una dieta estándar, los ratones deficientes para ApoE presentan unos niveles plasmáticos de colesterol muy elevados y desarrollan grandes lesiones ateroscleróticas ampliamente distribuidas por la aorta que además, pueden ser exacerbadas con dieta grasa (29–31). Un análisis cronológico de estas lesiones revela los eventos que se suceden en la aterogénesis. Los ratones deficientes para ApoE son, actualmente, los más utilizados para el estudio de la aterosclerosis experimental, de hecho, se ha examinado la participación de muchos genes implicados en el desarrollo de la aterosclerosis cruzando animales manipulados genéticamente para esos genes con ratones ApoE^{-/-} (57).

Otras posibles aproximaciones, son la utilización de ratones transgénicos, entre los que destacan los ratones que expresa formas mutantes de ApoE, como ApoE3Leiden (E3L) y ApoE (Arg 112→Cys→142). Estos ratones muestran un perfil lipídico comparable al mostrado por los pacientes con disbetalipoproteinemia (58).

También es importante destacar los modelos murinos de aterosclerosis acelerada por diabetes. La diabetes es un factor de riesgo cardiovascular muy importante y la principal complicación cardiovascular de la diabetes es la cardiopatía isquémica causada por una aterosclerosis acelerada. Existen diversos modelos disponibles para el estudio de la aterosclerosis y la cardiomiopatía asociada a la diabetes, incluyendo los ratones ApoE^{-/-} y los LDLR^{-/-} en los que se induce diabetes tipo I por Estreptozotocina (STZ). Además, existe un nuevo modelo animal que evita los efectos no específicos de la estreptozotocina, ratones deficientes para LDLR y, a su vez, transgénicos que expresan la glicoproteína del virus de la coriomeningitis linfocítica (LCMV) bajo el promotor de insulina de células pancreáticas. Estos ratones también desarrollan diabetes tipo I ya que, al infectarlos con LCMV, se produce la destrucción mediada por células T de las células β pancreáticas que expresan la glicoproteína de LCMV, un proceso muy similar al que conduce a la diabetes tipo I humana (59,60).

1.1.2 Factores de Riesgo

Determinadas condiciones o hábitos pueden aumentar las probabilidades de desarrollar aterosclerosis. Entre los factores de riesgo más importantes en el desarrollo de la lesión aterosclerótica se encuentran: la hipercolesterolemia e hipertrigliceridemia, la hipertensión, la resistencia a la insulina y *la diabetes*, el tabaquismo, el sedentarismo, el sobrepeso, la mala alimentación, el estrés, el consumo excesivo de alcohol, la edad, la presencia de antecedentes familiares de enfermedad cardiovascular, la apnea del sueño y/o los procesos inflamatorios (61,62). En esta tesis nos centraremos en uno de los factores de riesgo mas importante para el desarrollo de la aterosclerosis: la diabetes.

1.1.2.1 Diabetes

La diabetes mellitus es una alteración metabólica caracterizada por un estado de hiperglucemia persistente o crónico debido principalmente a un defecto en la secreción de insulina por las células β pancreáticas o a un uso inadecuado de la misma por parte del organismo, lo que conlleva a alteraciones en el metabolismo de hidratos de carbono, proteínas y lípidos. La severidad de los síntomas depende del tipo y la duración de la diabetes.

En 1997, la Asociación Americana de Diabetes, clasificó los distintos tipos de diabetes, distinguiendo entre tipo 1 (consistente en la destrucción autoinmune de las células β pancreáticas y deficiencia absoluta de insulina), tipo 2 (deficiencia y resistencia relativa a insulina), otros tipos (como enfermedad pancreática) y diabetes gestacional (63).

En la actualidad, la diabetes se está convirtiendo en una verdadera epidemia mundial. Según la Organización Mundial de la Salud el número de personas diabéticas ha aumentado de 171 millones en el año 2000 a 347 millones en 2014 y se estima, además, que siga aumentando en los próximos años. Teniendo en cuenta las predicciones de la Federación Internacional de Diabetes, una de cada diez personas será diabética en el año 2050 (64,65). Dada su elevada prevalencia y debido a las complicaciones agudas y crónicas que causa en la población, la diabetes se ha convertido en una de las enfermedades con mayor impacto socio-sanitario. Entre los problemas agudos que desencadena la diabetes los más frecuentes son la hipoglucemia, el estado hiperosmolar hiperglicémico y la cetoacidosis diabética, causados principalmente por una descompensación (déficit o exceso total o relativo) en la cantidad de insulina presente en el organismo. Entre las complicaciones crónicas de la diabetes se incluyen las microvasculares (retinopatía, neuropatía y nefropatía) y las macrovasculares (enfermedad cardíaca, cerebrovascular y enfermedad vascular periférica), responsables de una reducción importante en la calidad de vida del paciente y del 50 al 80% de las muertes de los enfermos diabéticos (66). De hecho, los pacientes con diabetes, tienen un aumento del riesgo cardiovascular de 3 a 5 veces si los comparamos con la población no diabética (67,68). Asimismo, otros factores de riesgo cardiovascular como la presencia de hipertensión o niveles lipídicos anormales son mas frecuentes en la población diabética, lo que acentúa el riesgo de sufrir un evento cardiovascular (67). Sin embargo, a pesar de esta asociación, estos factores de riesgo solo contribuyen como máximo en un 25% de riesgo de sufrir aterosclerosis coronaria en pacientes diabéticos (69), lo que indica que la diabetes es un factor crítico en el desarrollo de la lesión aterosclerótica (70).

Los mecanismos biológicos implicados en el desarrollo de las complicaciones vasculares de la diabetes aún no se conocen completamente, pero sabemos que la disfunción endotelial, la inflamación y el estrés oxidativo, juegan un papel muy relevante (71,72). De

hecho, numerosos estudios realizados en pacientes diabéticos y en modelos experimentales han demostrado que la hiperglucemia tiene un importante papel proaterogénico, ya que la concentración elevada de glucosa altera la función del endotelio arterial promoviendo la adhesión de leucocitos a las células endoteliales en las etapas iniciales de la formación de la lesión aterosclerótica (73). La hiperglucemia crónica también induce cambios epigenéticos (p. ej. metilación y acetilación) en los promotores de genes prooxidantes y proinflamatorios de las células endoteliales (74) promoviendo la formación de productos de glicosilación avanzada (AGE) los cuales, al interactuar con sus receptores presentes en las células endoteliales, activan la expresión de moléculas de adhesión (75). Además, la hiperglucemia provoca la activación de la ruta de la proteína quinasa C (PKC), lo que disminuye la expresión de la óxido nítrico sintasa y aumenta la expresión de factores proinflamatorios. Asimismo, los niveles elevados de glucosa inducen cambios fenotípicos en las CMLV, que pasan de un estado quiescente y contráctil a uno proliferativo y secretor con mayor capacidad migratoria y expresión de genes proinflamatorios (76). Todos estos cambios facilitan el desarrollo y progresión de la lesión aterosclerótica.

2. La Superfamilia del Factor de Necrosis Tumoral

Las citoquinas son un amplio y diverso grupo de proteínas, que se unen a receptores de membrana y regulan un gran número de procesos biológicos, entre los que destacan procesos involucrados en desarrollo, hematopoyesis, inflamación, respuesta inmune y reparación tisular (77).

La superfamilia del factor de necrosis tumoral (TNF) forma un subgrupo de citoquinas y receptores que ha atraído un considerable interés como fuente potencial de dianas terapéuticas para el tratamiento de enfermedades humanas complejas. Los ligandos de la superfamilia de TNF se expresan principalmente en forma de proteínas transmembrana de tipo II (proteínas con el dominio C-terminal situado en el espacio extracelular). En determinados casos, estas proteínas se procesan en formas secretadas que conservan su actividad biológica. Tanto las citoquinas ancladas como las solubles contienen un dominio C-terminal homólogo de la superfamilia de TNF, que media la autotrimerización y la unión al receptor. Los miembros de la superfamilia de TNF se unen a uno o más miembros de la

superfamilia de receptores de TNF (TNFR) siendo la mayoría de ellos proteínas transmembrana de tipo I o tipo III. Estos receptores se caracterizan por la presencia de una región de unión a ligando extracelular que contiene de uno a cuatro dominios ricos en residuos de cisteína y una cola citoplasmática con uno o más sitios de unión a proteína (78,79).

2.1. TWEAK y Fn14.

Entre los diferentes miembros de la superfamilia del TNF, nuestro grupo ha puesto su foco de atención en el efecto que pueda tener el factor inductor débil de apoptosis similar al factor de necrosis tumoral (TWEAK), durante el remodelado vascular patológico. En 1997 el grupo de Chicheportiche y col. identificaron a TWEAK (también conocido como TNFSF12, APO3L, CD255) como una glicoproteína transmembrana de tipo II de 249 aminoácidos codificada por un gen localizado en la posición 17p13.1. Esta proteína está formada por un dominio C-terminal extracelular de 206 aminoácidos que contiene el sitio de unión al receptor y un sitio de N-glicosilación (80), un dominio transmembrana de 25 aminoácidos y un dominio N-terminal intracelular de 18 aminoácidos. La mayoría de las células expresan dos isoformas de TWEAK, una forma anclada a la membrana (mTWEAK) de 30 KDa y otra forma soluble (sTWEAK) de 18 Kda que se forma por el procesamiento proteolítico por la acción de una serin-proteasa (furina) de la isoforma anclada a la membrana (81,82) y que básicamente está formada por la región C-terminal con el subdominio de unión al receptor (**Figura 5**). Los genes humano y murino de TWEAK presentan una similitud del 93% en la secuencia de unión al receptor, hecho inusual dentro de la superfamilia del TNF y que podría indicar la importancia de ésta proteína.

La configuración espacial en estructura de lámina β que adopta el dominio de unión al receptor permite que TWEAK se organice en trímeros. Las ranuras que quedan entre las subunidades del trímero constituyen los lugares de unión del receptor.

El ARN mensajero (ARNm) de TWEAK se expresa en numerosos tejidos y tipos celulares, alcanzando niveles relativamente altos en ciertos órganos, como son corazón, cerebro, músculo esquelético y páncreas. Los tejidos relacionados con el sistema inmune, como nódulos linfáticos y timo, también expresan ARNm de TWEAK. Además, se ha detectado en la placenta durante el primer trimestre de embarazo (83), en varias líneas celulares de origen tumoral (80,84), macrófagos peritoneales de ratón (85), fibroblastos humanos (86),

eritroblastos (87) y en el sistema nervioso central, tanto en células endoteliales como astrocitos y neuronas (88). TWEAK es una citoquina multifuncional que regula múltiples procesos entre ellos proliferación, migración, supervivencia, diferenciación y muerte celular cuando se añade a cultivos celulares de células tanto primarias como inmortalizadas de humanos, rata o ratón (89).

En 2001 se identificó el primer y, hasta ahora único, receptor funcional de TWEAK (TWEAKR) (90). Posteriormente se demostró que TWEAKR era, en realidad, idéntico al factor inducible de crecimiento de fibroblastos 14 (Fn14, TNFRSF12A, CD266), habiéndose descrito previamente como el producto de un gen inducible por factores de crecimiento en fibroblastos murinos (91). Como su propio nombre indica, Fn14 es altamente inducible en respuesta a múltiples factores de crecimiento y citoquinas en la superficie de células epiteliales, endoteliales y otros tipos de células mesenquimales. Su expresión es prácticamente indetectable en tejidos sanos, pero en el contexto de daño tisular se induce de forma muy brusca (89).

Fn14, es de una proteína transmembrana de tipo I con 129 aminoácidos y 13,911 KDa de peso molecular (90,92). Cuando se procesa, es el miembro más pequeño de los receptores de la superfamilia del factor de necrosis tumoral (TNFRSF), cuya región extracelular de unión al ligando tiene una longitud de 53 aminoácidos y contiene un único dominio rico en cisteína por donde se une al ligando. El dominio intracelular, de tan solo 28 aminoácidos, contiene un único motivo de unión a proteínas TRAF (**Figura 5**). TRAF1, TRAF2, TRAF3, TRAF5 y TRAF6 son capaces de unirse a este sitio. Cabe destacar, que la región citoplasmática de Fn14 no contiene dominio letal, que sí presentan otros TNFRs, por lo que el mecanismo por el cual TWEAK media muerte celular aún no esta totalmente descrito. Dos publicaciones recientes propusieron un posible mecanismo por el cual TWEAK podría disminuir la concentración del complejo TRAF2/cIAP lo que daría como resultado la muerte celular mediada por TNF α /TNFR1 (93,94). Sin embargo, esto no explicaría otros tipos de muertes inducidas por TWEAK e independientes de TNF (95). Fn14 se expresa en una gran variedad de tejidos adultos, alcanzando niveles relativamente altos en corazón, riñón, pulmones y placenta, así como en cultivos celulares de células endoteliales procedentes de vena umbilical y células del músculo liso en estado proliferativo.

Es importante señalar que ningún otro miembro conocido de la superfamilia del TNF tiene capacidad de unión a Fn14. Como en el caso de TWEAK, los receptores Fn14 humano y murino presentan una similitud de aproximadamente el 90%, y ambos tienen características estructurales típicas de la TNFRSF.

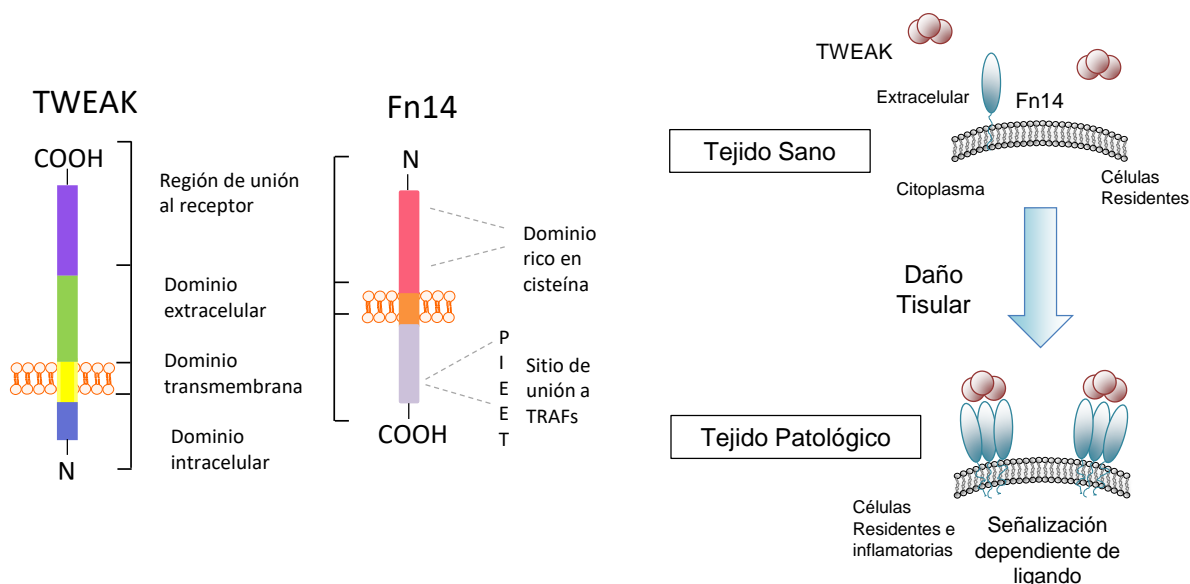


Figura 5: Representación esquemática de la estructura de TWEAK y su receptor Fn14, así como su ligación y señalización.

Finalmente, en 2007 se describió la existencia de un nuevo receptor para TWEAK, CD163 (96). CD163 es un receptor basurero de expresión restringida a monocitos/macrófagos responsable de aclarar de la circulación los complejos haptoglobina-hemoglobina. Este receptor también es capaz de unir, internalizar y degradar TWEAK, por lo que podría actuar como un receptor basurero en situaciones patológicas (97). Sin embargo, la capacidad de unión de CD163 a TWEAK necesita ser confirmada en estudios *in vivo*.

3. Señalización a través del sistema TWEAK-Fn14.

La unión de TWEAK soluble a su receptor causa la trimerización de este y la transducción de señal (98) (**Figura 5**). Sin embargo, no solo TWEAK soluble puede asociarse a Fn14. Recientemente se ha demostrado que las células que tienen TWEAK anclado a su membrana pueden unirse de forma juxtacrina a células vecinas que tengan Fn14 como receptor de superficie (99). La trimerización de Fn14 induce el reclutamiento de las proteínas TRAF, través de su motivo de unión a TRAF (PIEET). Este motivo es el responsable de la

activación de diferentes cascadas de señalización, como la vía de señalización del factor de transcripción nuclear kappaB (NF-κB), tanto la canónica (p50/p65) como la no canónica (p52/RelB), la vía de las MAPKs, la vía de PI3K/AKT (100), así como de la activación de la vía de JAK/STAT (101), entre otras (**Figura 6**).

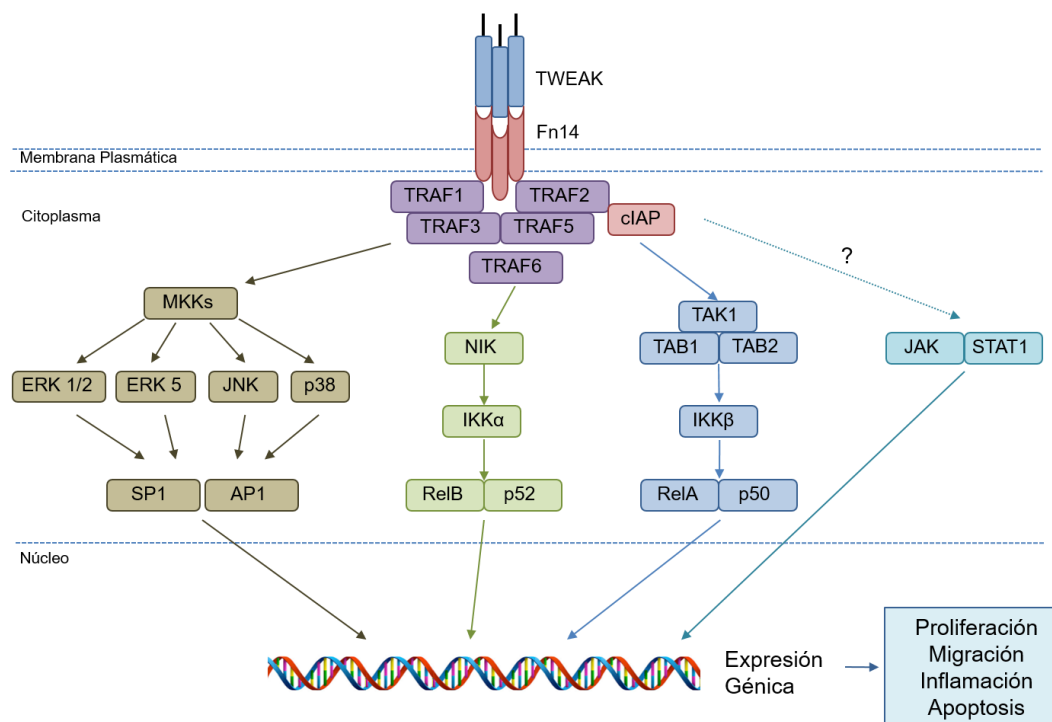


Figura 6: Vías de señalización activadas por el eje TWEAK/Fn14.

TWEAK es capaz de inducir una activación prolongada de NF-κB a través de una inducción bifásica de la vía canónica y no canónica (102). Esta activación prolongada explicaría la contribución de TWEAK en la patogenia de enfermedades inflamatorias crónicas. La activación de NF-κB por TWEAK, participa en la sobreexpresión de múltiples citoquinas implicadas en el reclutamiento de células inflamatorias hacia la pared de los vasos dañados. De hecho, TWEAK incrementa la expresión de MCP-1 y RANTES en CMLV (103). TWEAK también activa NF-κB en la línea celular monocítica Thp-1 (100) y en placas ateroscleróticas de ratones deficientes para ApoE (104). Además, TWEAK activa las MAPK, aunque la activación de las vías ERK, c-JunN-terminal kinase (JNK), o p38 depende del microambiente celular. Se ha observado la activación de las MAPKs en múltiples líneas celulares, incluyendo la línea monocítica Thp-1, las células endoteliales, cardiomiocitos, fibroblastos, entre otras...(100,105–108).

3.1. Señalización a través del factor de transcripción NF- κ B

NF- κ B es una familia de factores de transcripción pleiotrópicos que integran una complicada red de genes extracelulares y vías de señalización que regulan la transcripción de cientos de genes relacionados con inflamación, inmunidad, apoptosis, proliferación celular y diferenciación (109). En mamíferos, esta familia consta de 5 miembros: RelA (p65), RelB, c-Rel, NF κ B1 (p50/p105) y NF κ B2 (p52/p100), que comparten un dominio N-terminal de homología Rel responsable de la unión al DNA, de la homo- y heterodimerización y de la interacción con sus correspondientes proteínas inhibidoras I κ B (110). Entre los numerosos estímulos que activan la vía NF- κ B destacan varias citoquinas, factores de crecimiento, agentes infecciosos, roturas de ADN de doble cadena inducidas por radiación, estrés metabólico, diversos mediadores inmunes como las inmunoglobulinas e incluso la proteinuria (111).

Existen diversas vías de activación de NF- κ B, cada una de ellas constituida por sus dímeros característicos. De forma general se han descrito dos rutas: la vía canónica y la vía alternativa. En la vía canónica el heterodímero está formado por las proteínas p50 y p65 (RelA) (*Figura 7*). Esta combinación es la más abundante y es la que generalmente conocemos como NF- κ B. En células en reposo, el factor de transcripción se presenta asociado a su correspondiente proteína represora denominada I κ B. La familia de I κ B está compuesta por siete proteínas: I κ B α , I κ B β , BCL-3, I κ B ϵ , I κ B γ y los precursores p105 y p100. La inactivación de NF- κ B por parte de estas proteínas se consigue reteniendo en el citoplasma las proteínas que forman el complejo NF- κ B enmascarando su señal de localización nuclear (SLN).

En la vía canónica de activación el dímero constituido por las proteínas p50 y p65 está unido a la proteína inhibidora I κ B α . La unión del ligando a su receptor (TNFR-1, TRAF2) (110) conduce a la activación del complejo IKK (I κ B quinasa) mediante autofosforilación. La desaparición de la proteína represora I κ B libera los heterodímeros p50/p65 haciendo que la SLN quede expuesta, permitiendo su translocación al núcleo. Una vez en el núcleo, el dímero p50/p65 se une a los elementos κ B (GGGRNNYYCC, donde R es una purina, Y una pirimidina y N puede ser cualquier base) (112) de los promotores de los genes diana; induciendo, de esta manera, la transcripción de factores pro-inflamatorios como citoquinas (IL-1, IL-6, TNF- α), quimioquinas (MCP-1, RANTES), factores de crecimiento (TGF- β , PDGF), moléculas de

adhesión (ICAM, VCAM, selectina), enzimas (COX-2, iNOS) y proteínas de fase aguda entre otras muchas (113,114).

En la vía alternativa de activación el heterodímero está formado por las proteínas p52 y RelB (**Figura 7**). La unión del ligando a su receptor activa la quinasa inductora de NF- κ B (NIK) lo que conduce a la fosforilación y posterior procesamiento vía proteasoma del precursor NF κ B2 p100 y su conversión a la forma madura p52 que dimerizará con la proteína RelB permitiendo su traslocación al núcleo (115).

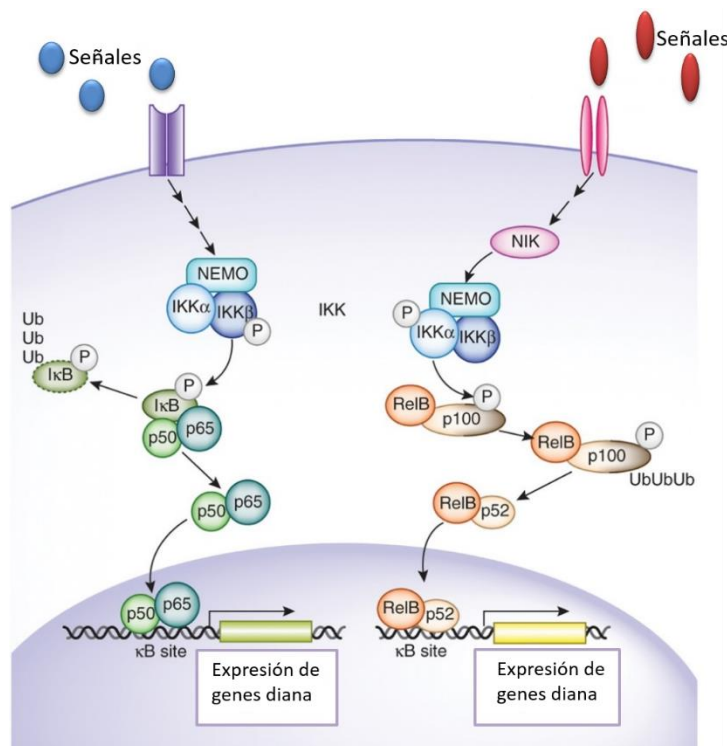


Figura 7. Esquema de las vías canónica y no canónica de activación del factor nuclear kappa B. Modificado de Gerondakis et al (116)

Se ha comprobado la presencia de este factor de transcripción en el interior de las placas ateroscleróticas, especialmente en los hombros de las lesiones, donde hay un alto contenido en macrófagos y demás componentes inflamatorios (117). La activación de la señalización mediada por NF- κ B está presente en todas las etapas de la aterosclerosis, desde la formación de la placa hasta su desestabilización y rotura.

Como veremos posteriormente en el apartado 4, el factor de transcripción NF- κ B puede ser activado por el eje TWEAK/Fn14, promoviendo la respuesta inflamatoria asociada al desarrollo y progresión de la lesión aterosclerótica.

3.2. Señalización a través de la ruta JAK/STAT

La vía JAK/STAT es un mecanismo intracelular esencial de citoquinas, pero también de moléculas proaterogénicas y otros factores activados por la diabetes, que regula la expresión de múltiples genes implicados en proliferación, diferenciación celular e inflamación (118). Constituye la conexión entre los receptores de la superficie celular y la activación de la maquinaria transcripcional en el núcleo (119,120). El sistema está constituido por la tirosina quinasa JAK, el factor de transcripción STAT y diversas proteínas reguladoras. En presencia de estímulos externos como citoquinas, se produce en la célula la unión del ligando a su receptor transmembrana, de forma que las proteínas JAK asociadas al receptor (dos o más) se ponen en estrecha proximidad a través de la oligomerización del receptor, promoviendo su autofosforilación y/o transfosforilación. Una vez activada, JAK fosforila residuos de tirosina en la región citoplasmática de los receptores para crear sitios de reconocimiento SH2 (dominio de homología Src-2) para miembros de la familia STAT. Las proteínas STAT unidas al receptor son entonces fosforiladas por JAK, lo que favorece su dimerización y posterior translocación al núcleo, donde inician la transcripción de los genes diana (121) (**Figura 8**).

La familia JAK está formada por cuatro proteínas de 120-130 kDa (JAK1, JAK2, JAK3 y TYK2), que contienen una región N-terminal de unión al receptor y dos dominios con actividad quinasa separados por una pequeña región bisagra (122). Por su parte, la familia STAT consta de siete miembros (STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5A, STAT5B y STAT6) que comparten regiones de alta homología, incluyendo un dominio N-terminal, un dominio espiral, un dominio de unión al DNA, un dominio SH2 y un dominio de transactivación en el extremo C-terminal (123). Este último contiene dos residuos aminoacídicos (Tyr701 y Ser727 en STAT1; Tyr705 y Ser727 en STAT3) cruciales para la actividad de la proteína STAT, de manera que la fosforilación en tirosina por JAK promueve la dimerización de STAT, mientras que la fosforilación en serina por parte de la familia de quinasas activadas por mitógenos aumenta su activación transcripcional (123,124).

Las proteínas STAT se encuentran de forma latente en el citoplasma y su fosforilación promueve la formación de homodímeros (STAT1, STAT3, STAT4, STAT5A y STAT5B) o heterodímeros (STAT1-STAT2 y STAT1-STAT3) a través de su dominio SH2. Después, los dímeros activos se translocan rápidamente al núcleo, donde se unen a la secuencia GAS (secuencia activada gamma) del DNA, activando la expresión génica de quimioquinas (CCL2, CCL5, IL-8 y CXCL10), moléculas de adhesión (VCAM-1 e ICAM-1), proteínas de matriz (colágeno IV) y genes de respuesta temprana (c-fos y c-jun), entre otros (125). A veces, los dímeros de STAT pueden interaccionar con otros factores para formar complejos capaces de reconocer otros elementos de unión al DNA, como ISRE (elemento de respuesta estimulado por IFN) (122,126). En general, STAT1 y STAT2 transducen señales de IFN (α , β , γ); STAT3 es activado por IL-6, IL-10, el factor de crecimiento epidérmico y el factor de crecimiento derivado de plaquetas; STAT4, STAT5A y STAT5B transducen la señal del receptor de IL-12; mientras que STAT6 es importante para la señalización de IL-4 e IL-13 (120)

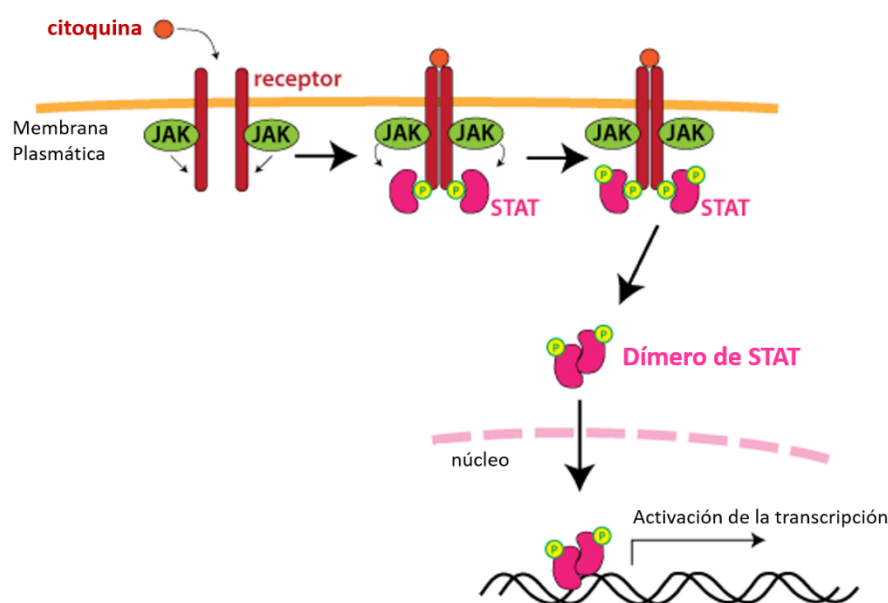


Figura 8. Representación esquemática de la vía JAK/STATS

Además de su activación clásica a través de receptores de citoquinas, la vía JAK/STAT también puede asociarse a receptores de AngII, quimioquinas, lipoproteínas, glucosa, AGE, insulina o inmunoglobulinas (127,128). En este sentido, estudios previos han demostrado que la activación de JAK2, STAT1 y STAT3 participan en las respuestas de las células vasculares y renales inducidas por la hiperglucemia o tras estimulación con agentes inflamatorios y aterogénicos. (118,129,130).

4. Papel de TWEAK y Fn14 en el AAA y la aterosclerosis

Durante los últimos años, el papel que desempeña el eje TWEAK/Fn14 durante el desarrollo y progresión de la lesión aterosclerótica ha sido ampliamente estudiado. Como se ha comentado anteriormente, TWEAK se expresa en la pared arterial tanto sana como patológica (131). Sin embargo, Fn14 está prácticamente ausente en tejido sano, aumentando fuertemente bajo circunstancias patológicas, como en el caso de placas ateroscleróticas carotídeas (131), femorales (132) y en el AAA (133). El incremento de la expresión de Fn14 está inducido por diversos estímulos como citoquinas (IL-1 β e IFN- γ) y factores de crecimiento (PDGF-BB, EGF, FGF-2), angiotensina II o α -trombina en CMLV de aorta humana y de rata (90,96). Además, se ha comprobado que VEGF-A y FGF-2 aumentan la expresión de Fn14 en células endoteliales de cordón umbilical humano (HUVEC) (105) y la estimulación con IFN- γ o con PMA lo hacen en monocitos CD14⁺ (134).

En las primeras fases del desarrollo de la placa aterosclerótica son las moléculas de adhesión y las quimioquinas las responsables del reclutamiento de las células inflamatorias. Estudios *in vitro* han demostrado que la unión de TWEAK/Fn14 induce la expresión de moléculas de adhesión como ICAM-1 y E-selectina, así como la secreción de IL-8 y MCP-1 en células HUVEC (135).

Durante la progresión de la lesión aterosclerótica, el eje TWEAK/Fn14 es capaz de inducir la expresión de proteínas proinflamatorias como IL-6, IL-8, MCP1 y RANTES, moléculas de adhesión, quimioquinas, citoquinas y MMPs en diferentes tipos celulares, lo que perpetúa un bucle inflamatorio, coordina la infiltración de las células circulantes, incrementa la proliferación y migración de CMLV y endoteliales, dando lugar al engrosamiento de la intima y al remodelado de la matriz extracelular (90,98,102,105,131,135–137).

La respuesta inflamatoria inducida por TWEAK está controlada, al menos en parte por el factor de transcripción NF- κ B. Así, nuestro grupo ha demostrado que la inyección sistémica de TWEAK recombinante en ratones hiperlipidémicos, deficientes para ApoE induce la activación de NF- κ B (103). La activación de NF- κ B por TWEAK observada en este modelo experimental, se producía a través de la vía canónica, ya que se detectaron los dímeros p50/p65 en el núcleo de las células presentes en las lesiones ateroscleróticas. En la misma línea de evidencia, la delección génica de TWEAK o el tratamiento con un anticuerpo bloqueante anti-TWEAK disminuye la activación de NF- κ B, así como la respuesta inflamatoria y la secreción de quimioquinas en ratones deficientes para ApoE (138). Hasta ahora, la activación de la vía no canónica inducida por TWEAK no se ha observado en las placas ateroscleróticas.

En placas avanzadas, la estabilidad depende de la integridad de la capa fibrosa que recubre el núcleo lipídico. Las placas estables suelen tener una capa fibrosa densa. Sin embargo, la inflamación sostenida, la acumulación de macrófagos y la apoptosis pueden debilitarla haciéndola vulnerable y propensa a la rotura. Este debilitamiento depende de la actividad de las MMPs, endopeptidasas que degradan el colágeno y que son secretadas por CMLV y macrófagos (139). TWEAK, Fn14 y diferentes MMPs colocalizan en regiones ricas en macrófagos y células espumosas en las placas de ateroma. El empleo de un anticuerpo que activa la señal a través de Fn14, incrementa la expresión de MMP-9 y MMP1/13 en monocitos en cultivo (140). Además, nuestro grupo ha demostrado recientemente como el tratamiento con un anticuerpo anti-TWEAK, disminuye la actividad de las MMPs en las placas ateroscleróticas de las válvulas aórticas en ratones deficientes para ApoE, dando lugar a un aumento de las características de estabilidad de las placas ateroscleróticas como el cociente colágeno/lípidos, una reducción del contenido de macrófagos, una menor presencia de xantomas laterales, capsulas enterradas, erosión medial, hemorragia intraplaca, o un menor contenido de calcio (138). Estos datos indican la implicación de TWEAK en la progresión de la lesión aterosclerótica, favoreciendo la inestabilidad de la misma.

La rotura o erosión de la placa y la consecuente trombosis, representa una de las principales complicaciones de la aterosclerosis ya que puede derivar en un evento cardiovascular. El inhibidor del activador del plasminógeno 1 (PAI-1) y el factor tisular (TF) son responsables de la hemostasis y la trombosis (141). TF es el principal iniciador de la cascada

de coagulación, mientras que PAI-1 juega un papel imprescindible inhibiendo la fibrinólisis, por lo que la actividad de PAI-1 y de TF promueven la trombosis (142) Recientemente también se ha demostrado como Fn14 colocaliza con ambas moléculas en placas ateroscleróticas humanas. Además, TWEAK incrementa la expresión ambas moléculas, tanto a nivel de RNAm como de proteína, así como su actividad en CMLV de aortas humanas en cultivo. (60). Del mismo modo, la inyección sistémica de TWEAK recombinante, aumenta la expresión de TF y PAI-1 en las placas ateroscleróticas de ratones deficientes para ApoE y, por el contrario, el tratamiento con un anticuerpo anti-TWEAK disminuye la expresión de ambas proteínas (143). Estos datos sugieren que el eje TWEAK/Fn14 participa en la respuesta protrombótica asociada a la rotura de la placa aterosclerótica.

Aunque con los datos que disponemos hasta el momento ha quedado demostrado que el eje TWEAK/Fn14 participa en el desarrollo de la lesión aterosclerótica, se desconoce si este sistema está implicado en otros modelos de remodelado vascular patológico. De hecho, hasta la fecha lo único descrito es la presencia tanto de TWEAK como de su receptor en muestras de AAA humano, colocalizando con CMLV, macrófagos y neutrófilos (133).

Por lo tanto, en esta tesis nos centraremos en el papel que juega el eje TWEAK/Fn14 en otras situaciones de remodelado vascular como son el AAA y la aterosclerosis acelerada por diabetes.

II.HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

La enfermedad cardiovascular es la primera causa de morbilidad en los países occidentales, de ahí que la búsqueda de nuevas dianas terapéuticas sea un tema de máxima actualidad.

Hipótesis:

Teniendo en cuenta los estudios previos llevados a cabo por nuestro grupo en los que se ha demostrado que:

- Los niveles de TWEAK soluble en plasma son capaces de predecir la expansión del AAA, lo que sugiere la implicación del eje TWEAK/Fn14 en esta patología, y su potencial uso como biomarcador diagnóstico y pronóstico en la enfermedad aneurismática (133)
- La inyección sistémica de TWEAK aumenta el tamaño de la lesión, y la carga aterosclerótica e induce la expresión de proteínas inflamatorias, en un modelo de aterosclerosis experimental en ratones deficientes en ApoE y además induce la expresión y secreción de quimioquinas *in vitro* (103).
- La delección genética o el tratamiento con un anticuerpo anti-TWEAK reducen el daño vascular y mejoran la estabilidad de las placas ateroscleróticas, en ratones ApoE (138).

Nuestra hipótesis postula que la inhibición genética o terapéutica del eje TWEAK/Fn14 podría ser beneficiosa para el tratamiento de enfermedades que involucren remodelado vascular como son el AAA y la aterosclerosis acelerada por diabetes.

Para demostrar nuestra hipótesis nos planteamos los siguientes objetivos:

1.- Estudiar la implicación de TWEAK y Fn14 en el desarrollo del AAA. Mediante un modelo experimental de AAA inducido por elastasa en ratones deficientes para TWEAK o Fn14, analizaremos el efecto de la delección de este eje, sobre las lesiones aneurismáticas. Entre los parámetros que estudiaremos se encuentran la presencia o ausencia de dilatación aórtica en los diferentes genotipos, el contenido inflamatorio de las lesiones, y parámetros clave en esta enfermedad como son la apoptosis de CMLV o la degradación de la elastina.

2.- Evaluar la participación del eje TWEAK/Fn4 en la aterosclerosis acelerada por diabetes.

La aterosclerosis es una de las principales causas de muerte, asociada a esta enfermedad metabólica, que además está creciendo de forma exponencial en los últimos años. Para ello realizaremos un modelo experimental en ratones doble delecionados para TWEAK y ApoE a los que induciremos diabetes mediante inyección con estreptozotocina. Para analizar el efecto de la deleción de este eje, sobre los ratones diabéticos, estudiaremos los siguientes parámetros: la carga aterosclerótica, y el tamaño de las lesiones en dos territorios vasculares propensos a formar placas como son el arco aórtico y la arteria braquioceflica, la progresión de las placas, así como parámetros de estabilidad que contribuyen a evitar la rotura de las placas y las consecuencias catastróficas asociadas. También analizaremos las vías de señalización implicadas en la respuesta inducida por TWEAK.

3.- Determinar el efecto de la intervención terapéutica sobre la progresión de las placas ateroscleróticas en los ratones diabéticos. A través de la inyección sistémica de un anticuerpo monoclonal bloqueante anti-TWEAK, valoraremos el efecto terapéutico de la inhibición de TWEAK sobre aceleración de la progresión de la placa aterosclerótica en los ratones diabéticos.

III.MATERIALES Y MÉTODOS

1. Muestras de AAA humanas

Se recogieron 10 muestras de AAA provenientes de la cirugía reparativa de pacientes adscritos al programa RESAA (144). Las muestras se obtuvieron bajo consentimiento informado por los pacientes. Además, se obtuvieron 10 muestras de aortas control, procedentes de donantes de órganos, fallecidos, con la autorización de la Agencia de Biomedicina Francesa (PFS 09-007). Estas aortas control eran macroscópicamente normales, y no presentaban ningún síntoma de lesión ateromatosa.

2. Cultivos Celulares

2.1. Cultivos primarios

Las **CMLV** se obtuvieron a partir de aortas de ratones de fenotipo salvaje y de ratones deficientes para Fn14 de 12-16 semanas de edad. Tras el sacrificio de los ratones, previamente anestesiados, se extrajeron las aortas y se eliminó la grasa y el tejido conectivo adherido. Los vasos troceados en piezas de aproximadamente 1 mm se incubaron durante 45 minutos a 37°C con 4 mg/mL de colagenasa tipo II (290 U/mg; Sigma) resuspendida en medio DMEM (Lonza) suplementado con 2 mM glutamina, 100 U/mL penicilina y 100 µg/mL estreptomicina. Tras varios lavados, las células resuspendidas en DMEM con 10% de suero fetal bovino (SFB) se sembraron en frascos de cultivo de 25 mm² y se incubaron a 37°C en atmósfera de 5% CO₂, reemplazando el medio cada 2-3 días. Las células se usaron entre el tercer y el séptimo pase. Antes de realizar los experimentos, las células se incubaron durante 24h en medio sin SBF.

Los macrófagos derivados de médula ósea (**BMDM**) se obtuvieron de ratones de fenotipo salvaje, deficientes para Fn14, de 12-16 semanas de edad. Tras el sacrificio, se esterilizaron las patas posteriores en alcohol al 70%, se aislaron los fémures quitando todo el tejido muscular y se realizó un corte en ambos extremos del hueso, extrayendo la médula ósea del fémur mediante la inyección de medio en el interior del hueso. La suspensión celular se sembró y diferenció durante 7 días en placas de cultivo con medio DMEM suplementado con 10% SFB, 2 mM glutamina, 100 U/mL penicilina y 100 µg/mL estreptomicina y 10% de medio condicionado de L-929, una línea celular productora de GM-CSF (concentración aproximada 400 pg/mL) (145). Antes de los experimentos las células se incubaron al 2% de SBF durante 24h.

2.2. Ensayos de viabilidad

Las CMLV de ratón se sembraron en placas de 24 pocillos (Corning) a una concentración inicial de 10^4 células/ml en 1ml de DMEM al 10% de SBF por pocillo y se cultivaron durante 16h. Posteriormente se incubaron en medio al 0% de SFB durante 24h y a continuación se estimularon con Elastasa porcina tipo I (Sigma, E120) con dosis que iban desde 0 a 0,5U/ml y con o sin TWEAK recombinante murino (R&D Systems) 100ng/ml. Tras 18h de estimulación se cuantifico el número de CMLV mediante el ensayo de incorporación de azul de metileno. Se fijaron las células con salino al 10% de formaldehído durante 30 minutos y posteriormente se incubaron durante 30 minutos con 1% (peso/volumen) de azul de metileno en 0,01 mol/L de tampón fosfato. Se quitó el exceso de tinción sumergiendo la placa en 0,01 mol/L de tampón de borato (pH 8,5). Para eluir la tinción se añadieron a cada pocillo 100ul de etanol, HCL en una relación 1:1 (v/v). Las placas se midieron a una absorbancia de 650 nm usando un lector de placas. Se calcularon y compararon los porcentajes de cambios de absorbancia.

2.3. Zimografía

Se sembraron CMLV y BMDM en placas de 24 pocillos (Corning) a una concentración inicial de 10^4 células/ml en 1ml de DMEM al 10% de SBF por pocillo y se cultivaron durante 16h, posteriormente se deplecionaron al 2% de SBF durante 24h. A continuación, se reemplazó el medio por 0.5 ml de DMEM al 2% de SBF por pocillo con diferentes concentraciones de TWEAK recombinante murino (R&D Systems). Tras 72 horas, se recogió el sobrenadante de las CMLV, se centrifugó, se eliminaron los debrís celulares, y se concentraron utilizando un microcon de 10 kDa de poro (Millipore) hasta un volumen final de 25 μ L. La actividad de las MMP se comprobó gracias a una zimografía en gel de gelatinasa (Zymogran gels, Life Technologies), siguiendo las instrucciones del fabricante. Para la zimografia de tejido, se homogeneizó la pared de los AAA o de la aorta torácica (control) de los distintos grupos de estudio y cargaron 10 μ l en un gel de zimografía de gelatinasa.

3. Modelos Animales.

En ambos modelos animales, los ratones se mantuvieron enjaulados, con agua y dieta normal *ad libitum*. El cuidado y mantenimiento de los animales, así como todos los procedimientos llevados a cabo durante la elaboración de esta tesis siguieron la normativa europea y nacional vigente (Directiva 2010/63/EU, Recomendación 2007/526/EC y Real Decreto 53/2013) y fueron previamente aprobados por el comité ético de nuestra institución.

3.1. Modelo de AAA por perfusión de elastasa

Para estudiar la implicación del eje TWEK/Fn14 en el desarrollo del AAA, se utilizaron ratones deficientes para *Tnfsf12* (TWEAK KO), o para Fn14 (Fn14 KO), así como sus homólogos salvajes (WT) previamente descritos (146,147), todos con bagaje genotípico C57BL/6 generosamente suministrados por Biogen Idec. A las 12 semanas de edad se les perfundió con 0.411U/ml de elastasa pancreática porcina tipo I (Sigma E120): Fn14 KO (N=15), TWEAK KO (N=15), WT (N=16) para producir AAA experimental, o con suero salino: Fn14 KO (N=6), TWEAK KO (N=5), WT (N=5) como controles, tal y como se describió previamente (148). Los animales fueron sacrificados a los 14 días post-perfusión, se les extrajo la aorta y la zona de máxima expansión se incluyó en OCT o parafina para posteriores análisis histológicos (**Figura 9**).

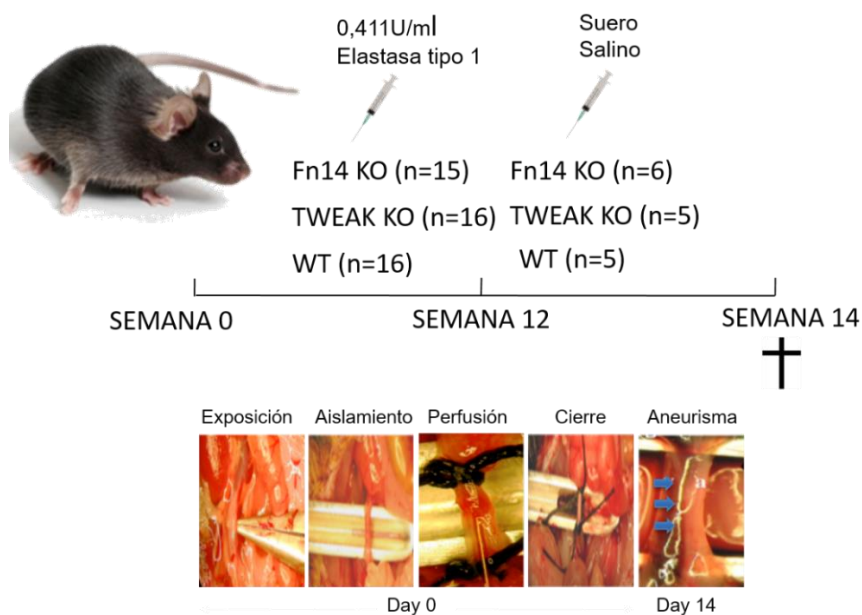


Fig 9. Representación esquemática del modelo animal utilizado para analizar la influencia del eje TWEAK/Fn14 en el desarrollo del AAA.

3.2. Modelo de Aterosclerosis acelerada por diabetes

Para estudiar la implicación del eje TWEK/Fn14 en la aterosclerosis acelerada por diabetes, se realizó un modelo experimental de diabetes tipo I por insuficiencia insulínica en ratones *Tnfsf12*^{-/-}*ApoE*^{-/-} y sus controles homólogos *Tnfsf12*^{+/+}*ApoE*^{-/-}, generados en nuestro laboratorio (138), mediante inyección intraperitoneal de estreptozotocina (STZ) (125 mg/kg/día; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) durante dos días consecutivos (149) (**Figura 10**). La STZ es una toxina producida por bacterias *Streptomyces* altamente tóxica para las células β -pancreáticas. Los ratones se pesaron cada 2-3 días y se les medía el nivel de glucosa en sangre y inyectándoles insulina (1-1,5UI) si superaban los 29mmol/L para mantenerles en un rango aceptable. Los 26 ratones *Tnfsf12*^{+/+}*ApoE*^{-/-} que desarrollaron diabetes (glucosa>19,4mmol/l) se dividieron de forma aleatoria para recibir tratamiento durante 10 semanas con un anticuerpo anti-TWEAK (10 mg/kg dos veces por semana; N=13) o con una inmunoglobulina G control (10 mg/kg dos veces por semana; N=13). El anticuerpo bloqueante anti-TWEAK (clon P2D10) se generó en ratones *Tnfsf12*^{-/-}(81). Además, se incluyeron en el estudio ratones diabéticos *Tnfsf12*^{+/+}*ApoE*^{-/-} (N=12) y *Tnfsf12*^{-/-}*ApoE*^{-/-} (N=12) y no diabéticos *Tnfsf12*^{+/+}*ApoE*^{-/-} (N=7), para analizar el efecto de la delección de *Tnfsf12* en la aterosclerosis acelerada por diabetes. Al finalizar el estudio, y tras 16h de ayuno, los ratones se anestesiaron (100 mg/kg ketamina y 15 mg/kg xilacina), se perfundieron con suero salino, y se sacrificaron. Se recogieron muestras de sangre para los análisis bioquímicos, que se realizaron en los laboratorios centrales de nuestro hospital, midiendo: el colesterol total en suero, HDL-c, LDL-c y triglicéridos.

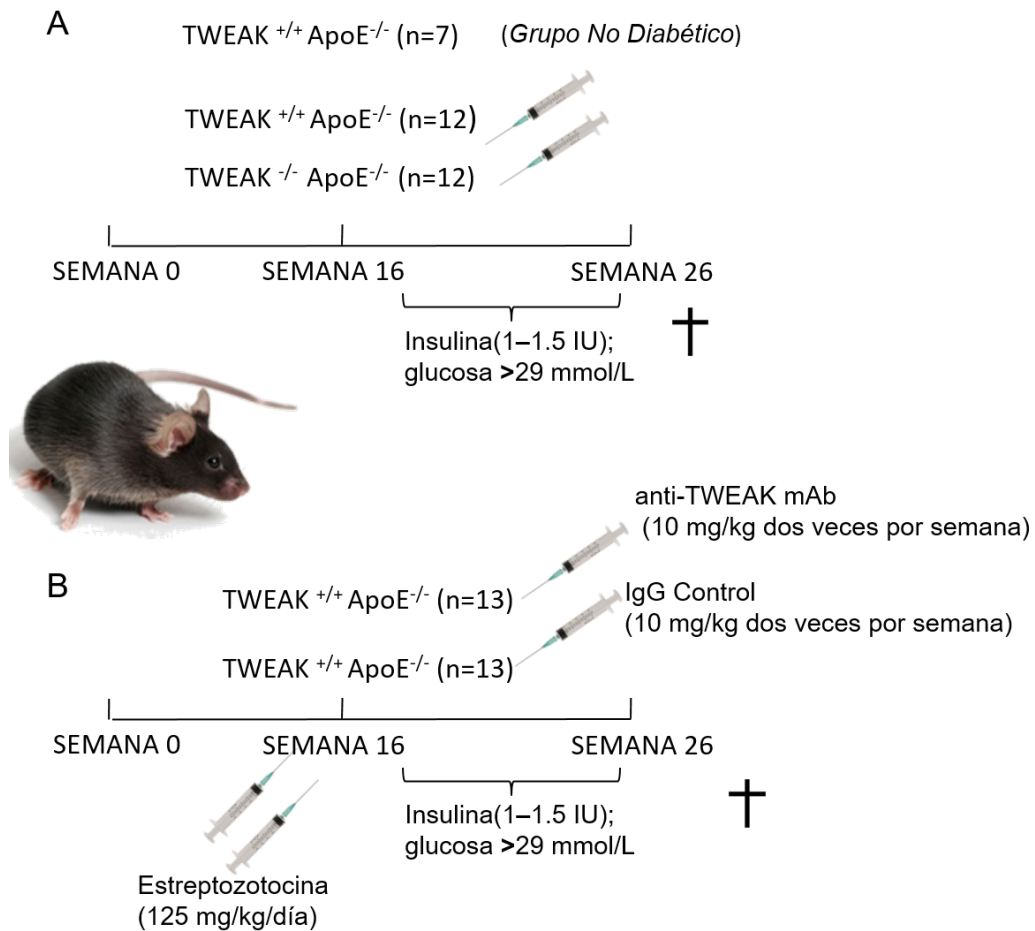


Fig 10. A. Representación esquemática del modelo animal utilizado para analizar la deficiencia de TWEAK en la aterosclerosis acelerada por diabetes. B. Representación esquemática del modelo animal utilizado para analizar la influencia del bloqueo terapéutico de TWEAK en la aterosclerosis acelerada por diabetes.

4. Análisis Histológicos

4.1. Tinción de aorta completa.

Las lesiones ateroscleróticas del modelo 3.3.1 se cuantificaron siguiendo un método de tinción denominado “en face” (de momento no existe una nomenclatura equivalente en español) que consiste en teñir la totalidad de la aorta. Para realizar el protocolo “en face” después de limpiar cuidadosamente la grasa y los músculos que rodean la aorta, se abrió longitudinalmente desde el cayado aórtico hasta las arterias ilíacas. Posteriormente, se trasladó a una bandeja de disección cubierta de parafina blanca solidificada donde se inmovilizó con alfileres de acero inoxidable de 0,2 mm de diámetro. Después de fijarla durante la noche con paraformaldehído al 4% y hacerle un lavado en PBS, la aorta se sumergió durante

6 minutos en una solución filtrada que contenía 0,5% Sudán IV, 35% de etanol, y 50% de acetona. Finalmente se destiñó en etanol al 80%. Las aortas teñidas se fotografiaron y se utilizaron para la cuantificación de la carga aterosclerótica total.

4.2. Análisis morfométrico del seno aórtico, la arteria braquiocefálica y el AAA.

Para el análisis morfológico de las lesiones ateroscleróticas, primero se diseccionó cuidadosamente la arteria braquiocefálica y la parte superior del corazón del modelo animal 3.3.1 y se congeló en OCT. Las válvulas aórticas se cortaron en secciones de 5 micras empezando por la sección del corazón en donde se observa por primera vez la presencia de las válvulas en el sitio de unión a la aorta. Los cortes resultantes se tiñeron con *Oil-Red-O* (Sigma-Aldrich) y hematoxilina (Dako) a intervalos de 100 micras desde el punto cero hasta llegar a las 1000 micras del punto de inicio. Calculamos el área de máxima lesión de cada ratón a partir de la media de los tres cortes con mayor lesión, y las áreas de máxima lesión individual se promediaron para determinar el área de máxima lesión para cada grupo. Para valorar la cantidad de colágeno presente en las placas, teñimos los arcos con *rojo pricosirio* (Sigma-Aldrich) y medimos la birrefringencia a la luz polarizada.

Las arterias braquiocefálicas se cortaron en secciones seriadas de 5 micras de espesor desde el cayado de la aorta hasta la arteria subclavía derecha. Para el análisis morfométrico, los cortes procedentes de cada arteria braquiocefálica se tiñeron siguiendo el protocolo *pentacrómico de Movat* (Electron Microscopy Sciences) en intervalos de 90 micras de una longitud total aproximada de 450 micras.

En el caso del modelo de AAA (3.3.2) primero se diseccionó cuidadosamente la aorta completa, eligiendo posteriormente la región infra-renal donde se había realizado la perfusión de elastasa o suero salino y se procedió a su inclusión en OCT o parafina. La lesión aneurismal se cortó en secciones seriadas de 5 micras de espesor hasta una longitud aprox. de 200 micras y se caracterizó la lesión en los cortes resultantes (cada 5 cortes) se utilizó la tinción *tricrómica de Masson* para cuantificar tanto el diámetro como el grosor intima-media, además se llevó a cabo la tinción de *Verhoeff Van Gieson* usando el kit de tinción de elásticas (Sigma-Aldrich, HT25A-1KT) siguiendo las instrucciones del fabricante y se cuantificó la fragmentación de la elastina siguiendo la clasificación previamente descrita (150): *Grado 1*: Laminas intactas y bien organizadas; *Grado 2*: Laminas elásticas con algunas interrupciones y roturas; *Grado 3*:

Laminas elásticas con múltiples interrupciones y roturas; *Grado 4*: Fragmentación severa de la elastina o pérdida de la misma.

4.3. Análisis inmunohistoquímico.

Las muestras incluidas en parafina procedentes de AAA humanas y del modelo experimental de AAA se desparafinaron y se rehidrataron. En el caso de las muestras incluidas en OCT, se fijaron con acetona fría durante 10 minutos.

La actividad de la peroxidasa endógena se inhibió sumergiendo los cortes en peróxido de hidrógeno al 3% en metanol-agua (1:1) durante 30 min y posteriormente se incubaron con PBS al 6% de albúmina de suero bovino durante una hora a temperatura ambiente para bloquear las uniones inespecíficas. Los anticuerpos primarios se incubaron durante toda la noche a 4° C. Los anticuerpos secundarios biotinilados se aplicaron durante una hora a temperatura ambiente a una dilución 1:200 en PBS al 6% albúmina de suero bovino. Después se incubaron las muestras con el complejo ABComplex/HRP (Vector Laboratories) durante 30 min. La localización del anticuerpo se determinó mediante la adición del cromógeno diaminobenzidina (DAB) o aminoetilcarbazol (AEC+) (ambos de Dako) durante 3-10 minutos. Por último, se aplicó a las secciones una tinción de fondo con hematoxilina (Dako). Los cortes procedentes de parafina se deshidrataron y montaron en DPX (British Drug House), mientras que los de OCT se montaron directamente con gelatina glicerilada Kaiser (Merck). En cada experimento se realizaron controles negativos sin el anticuerpo primario para comprobar que no existía tinción inespecífica.

Los anticuerpos primarios fueron: TWEAK (AF1090; R&D Systems), Fn14 (4403; Cell Signaling Technology) y MMP9 (LS-B2486; LifeSpan BioSciences Inc) en los AAA humanos. En los AAA del modelo experimental se utilizaron el marcador de monocitos/macrófagos MOMA-2 (MCA519G; AbD Serotec), el marcador de músculo liso alfa-actina (Clone 1A4; Sigma), el marcador de neutrófilos Ly-6B.2 (MCA7716A; AbD Serotec), el marcador de células endoteliales CD31 (550274; BD Pharmingen), el marcador de linfocitos CD3 (A0452; Dako), las quimioquinas CCL2 (sc-1785; Santa Cruz Biotechnology) y CCL5 (AB2109P; Chemicon), el marcador de proliferación Ki-67 (Clone SP-6; Abcam), y el de apoptosis cleaved-PARP (ab32064; Abcam). También se determinó la apoptosis en los AAA mediante el método de TUNEL, siguiendo las recomendaciones del fabricante (ApopTag Peroxidase In Situ Apoptosis

Detection Kit, S7100; Millipore Iberica). En el modelo de aterosclerosis acelerada por diabetes de utilizaron los siguientes anticuerpos primarios: el marcador de monocitos/macrófagos CD68 (Ab53444; Abcam), el marcador de músculo liso alfa-actina (Clone 1A4; Sigma), el marcador de fosfo-STAT1 (44-376G, ThermoFisher Scientific) y el de fosfo-STAT3 (sc7993, Santa Cruz Biotechnology) (**Figura 11**).

Como anticuerpos secundarios se utilizaron anti-cabra biotinilado hecho en burro, anti-conejo biotinilado hecho en burro, anti-rata biotinilado hecho en cabra (Amersham) y anti-cobaya biotinilado hecho en cabra (Abcam). Para los estudios de colocación del modelo 3.3.1 se utilizaron los anticuerpos secundarios Alexa Flúor 488 anti-conejo y Alexa Flúor 568 anti-rata.

Anticuerpo primario	Especie	Bloqueo	Concentración	Anticuerpo secundario	Concentración
(P) TWEAK (AF1090; R&D Systems)	Humano	6% caballo	1:10	Anti-cabra biotinilado, GE Healthcare	1:200
(P) Fn14 (4403; Cell Signaling Technology)	Humano	6% oveja	1:50	Anti-conejo biotinilado, GE Healthcare	1:200
(P) MMP9 (LS-B2486; LifeSpan BioSciences Inc)	Ratón	6% caballo	1:100	Anti-conejo biotinilado, GE Healthcare	1:200
(P) MOMA-2 (MCA519G; AbD Serotec)	Ratón	6% oveja	1:50	Anti-rata biotinilado, GE Healthcare	1:200
(M) α-actina-FITC Clone 1A4; Sigma	Ratón	Sin suero	1:1000	-----	-----
(P) Ly-6B.2 (MCA7716A; AbD Serotec)	Ratón	Sin suero	1:50	Anti-rata biotinilado, GE Healthcare	1:200
(P) CD31 (550274; BD Pharmingen)	Ratón	6% oveja	1:100	Anti-rata, biotinilado, GE Healthcare	1:500

(P) CD3 (A0452; Dako)	Humano	6% caballo	1:200	Anti-conejo biotinilado GE Healthcare	1:200
(P) CCL2 (sc-1785; Santa Cruz Biotechnology)	Ratón	6% caballo	1:50	Anti-cabra biotinilado, GE Healthcare	1:100
(P) CCL5 (AB2109P; Chemicon)	Ratón	6% caballo	1:100	Anti-conejo biotinilado, GE Healthcare	1:300
(M) Ki-67 (Clone SP-6; Abcam)	Conejo	6% oveja	1:10	Anti-conejo biotinilado, GE Healthcare	1:200
(M) cleaved-PARP (ab32064; Abcam)	Conejo	6% oveja	1:200	Anti-conejo biotinilado, GE Healthcare	1:200
(M) CD68 (Ab53444; Abcam)	Rata	6% oveja	1:50	Anti-rata biotinilado, GE Healthcare	1:200
(P) p-STAT1 (44-376G, ThermoFisher Scientific)	Ratón	6% oveja	1:20	Anti-conejo biotinilado, GE Healthcare	1:200
p-STAT3 (sc8019, Santa Cruz Biotechnology)	Ratón/ Humano	6% caballo	1:100	Anti-cabra biotinilado, GE Healthcare	1:100

Figura 11. Listado de anticuerpos utilizados. Entre paréntesis se indica si el anticuerpo es monoclonal (M) o policlonal (P).

4.4. Análisis morfométrico de las inmunohistoquímicas.

Los análisis morfométricos asistidos por ordenador se realizaron con el software Image-Pro Plus (versión 1.0 para Windows). El umbral para la medición del área teñida fue el mismo para todas las imágenes. Las muestras de cada ratón se examinaron de forma ciega. Los resultados de lípidos, colágeno, macrófagos, neutrófilos, MCP-1, RANTES y alfa-actina se expresaron como porcentaje de área positiva respecto al área total; como células positivas por mm² en el caso de CD3 y CD31, Ki-67, cleaved-PARP, y TUNEL y como núcleos positivos por mm² en el caso de p-STAT-1 o p-STAT3.

4.5. SouthWestern.

Esta técnica se desarrolló en nuestro laboratorio para detectar *in situ* la activación de factores de transcripción (151). El primer paso fue utilizar una transferasa 3'-terminal (Roche) para marcar con digoxigenina un oligonucleótido consenso para NFκB procedente del promotor de RANTES (5'-AGTTGAGGGGACTTTCCCAGGC-3') (Promega). Las secciones de tejido embebidas en OCT se fijaron en paraformaldehído al 0,5% y después se trataron secuencialmente con 5mM de levamisol en PBS y 0,1 mg/mL de DNAsa I (Roche). La unión al ADN se realizó mediante la incubación con 50 pmol de sonda de ADN marcada en un buffer con 0.25% de albúmina de suero bovino y 1 g/ml de poly (dl-dC). Posteriormente las secciones se incubaron con un anticuerpo anti-digoxigenina conjugado con fosfatasa alcalina y el sustrato NBT/BCIP (Roche). La detección colorimétrica se realizó según el protocolo. Como control negativo se utilizaron secciones incubadas sin sonda y se utilizó un exceso de sonda sin marcar para testar la especificidad de la técnica. Los resultados se expresan como el porcentaje del área positiva versus el área total de la lesión.

5. Análisis de ARN: Extracción de ARN y PCR en tiempo real.

El ARN total procedente de las aortas de los ratones y de las CMLV y de las BMDM, en el caso del modelo explicado en el apartado 3.3.1, y proveniente de los AAA y las CMLV, en el caso del modelo expuesto en el apartado 3.3.2, se extrajo siguiendo las instrucciones de uso del reactivo Trizol (Invitrogen, Life Technologies). La cuantificación del ARN se realizó por medida de la absorbancia de las muestras a 260 nm, teniendo en cuenta que 1 unidad de absorbancia corresponde a 40 µg/ml de ARN. Se comprobó que el cociente entre las

absorbancias a 260 y 280 nm estaba entre 1,8 y 2, indicando que el ARN procesado es puro y no está contaminado por proteínas. La transcripción inversa se realizó con 2 µg de ARN total durante 2 horas a 37°C utilizando el High Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems, Life Technologies).

La PCR a tiempo real se realizó mediante el sistema de detección secuencial Taqman ABI 7700 usando una TaqDNA polimerasa activada por temperatura (Amplitaq Gold). Los cebadores y sondas Taqman utilizados se compraron a Applied Biosystems y se optimizaron según las instrucciones del fabricante: 18S, CCL5 (Mm01302427), CXCL10 (Mm00445235), ICAM-1 (Mm00516023) y TNF- α (Mm00443258), para el modelo de aterosclerosis acelerada por diabetes y 18S, TWEAK (Hs00387540) y Fn14 humanos (Hs00171993), y MMP2 (Mm00439498), MMP3 (Mm00440295), MMP9 (Mm00442991), y MMP13 (Mm00439491) murinos para el modelo de AAA. Después de un periodo inicial de 2 minutos a 50°C y de 10 minutos 95°C, las muestras pasaron por 40 ciclos de 15 segundos a 95°C y 1 minuto a 60°C. Se realizó la amplificación del ARN del 18S en paralelo junto con el gen de interés, para utilizarlo como control interno. Todas las medidas se realizaron por duplicado. La cantidad de ARNm diana se estimó mediante el método de cuantificación 2- Δ CT utilizando el programa de Applied Biosystems Sequence Detection Software versión 1.4.

6. Análisis de proteínas.

6.1. Western blot.

Las proteínas procedentes de las CMLV se extrajeron empleando un tampón de lisis compuesto por: 50 mM TrisHCl, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 2 mM EGTA, 25 mM NaF, 0,2% Tritón X-100, 0,3% NP-40, 0,1 mM PMSF.

La concentración de proteínas se determinó mediante el método del BCA (Thermo Scientific). Los lisados totales se analizaron por electroforesis en geles de poliacrilamida/SDS al 12%, se transfirieron a membranas PVDF (fluoruro de polivinilideno; Millipore) en 25 mM Tris pH=8,3, 150 mM glicina y 20% vol/vol metanol y se bloquearon con 5% leche en polvo desnatada en tampón TBSt (1 mM Tris pH 7.5, 10 mM NaCl y 0.1% Tween-20) durante una hora a temperatura ambiente, para evitar uniones inespecíficas.

A continuación, se incubaron con los correspondientes anticuerpos primarios: Fn14 (4403; Cell Signaling Technology), p-STAT1 (33-3400, ThermoFisher Scientific), p-STAT3 (9134, Cell Signaling Technology), y α -tubulin (T5168; Sigma), como control de carga interno, durante 16 horas a 4°C. Tras sucesivos lavados para eliminar el exceso de anticuerpo, se incubaron una

hora a temperatura ambiente con los correspondientes anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa (Jackson), detectando la proteína mediante el sistema de quimioluminiscencia ECL. Las membranas se densitometraron con el software ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare Bio-sciences). La cuantificación se expresa como unidades densitométricas arbitrarias (UDA).

6.2. ELISA.

Los sobrenadantes de las CMLV estimuladas con TWEAK a diferentes tiempos y dosis se utilizaron para hacer un ensayo ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay / ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas) específico para la quimioquinas CCL2 y CCL5 (MJE00 y MMR00; R&D Systems, respectivamente). Tomamos 100 µl de cada punto del experimento y realizamos el ensayo siguiendo las instrucciones del fabricante.

7. Transfección con ARN pequeño de interferencia.

Se transfectaron las CMLV cuando alcanzaron una confluencia del 60-70% con 25 nmol/L de un ARN pequeño de interferencia (siARN) frente a Fn14, STAT1 o un control negativo (scramble siARN; Ambion) usando el reactivo Lipofectamine RNAiMAX (Life Technologies). Las células transfectadas se trataron con TWEAK (100 ng/mL) en presencia de alta o baja concentración de glucosa durante 24 horas.

8. Tomografía de fluorescencia molecular

Para detectar las áreas de remodelado vascular, en el modelo de AAA, se monitorizó la actividad de ciertas MMPs *ex vivo*. Para ello se realizó a los ratones una inyección intravenosa con un agente fluorescente *imaging probe MMPsense-680* (2 nmol in 150 µL PBS; PerkinElmer) 24 horas antes de su sacrificio. La sonda MMPsense-680 se activa, gracias a la actividad proteasa de MMP-2, -3, -9 y -13, volviéndose fluorescente. Después de 24h, se extrajeron las aortas de los ratones previamente anestesiados con Ketamina/Xilacina (100 y 10 mg/kg, respectivamente). La actividad de estas MMPs se midió mediante Tomografía de fluorescencia molecular (FMT 1500; VisEn Medical, PerkinElmer) y se cuantificó con ayuda del software FMT1500.

9. Estadística

El análisis estadístico se realizó usando el software estadístico SPSS 11.0. Los datos se expresan mayoritariamente como la media \pm el error estándar de la media (EEM) excepto en la estadística referente a los experimentos *in vitro* en donde se expresan como la media \pm la desviación estándar (DE). Las diferencias entre grupos se determinaron usando un test Mann-Whitney o one-way ANOVA seguido del análisis post hoc Bonferrini en el caso de los modelos animales, y un T de Student para los estudios *in vitro*. Se estableció un valor máximo de probabilidad del 0,05 para ser estadísticamente significativo. Los experimentos *in vitro* se realizaron como mínimo tres veces.

IV.RESULTADOS

1. La deficiencia de TWEAK o Fn14, reduce el AAA inducido por elastasa en ratones.

1.1. TWEAK y Fn14 se expresan en el AAA de humanos

Como se ha comentado anteriormente, TWEAK se expresa en la pared aórtica sana mientras que la expresión de Fn14 es prácticamente inexistente (131). Sin embargo, en condiciones patológicas, la expresión de Fn14 aumenta de manera considerable. Para comprobar si TWEAK y/o Fn14 se sobreexpresaban en la pared del AAA humano, se extrajo RNAm de tejido aneurismático (N=6) así como de aortas sanas (N=6). Mediante la PCR a tiempo real observamos que tanto TWEAK como su receptor se expresaban en lesiones aneurismáticas humanas. Además, Fn14 se sobreexpresa en el AAA en comparación con el tejido sano. ($p < 0,05$ vs aorta sana; **Figura 12**). La presencia de TWEAK y Fn14 se confirmó por inmunohistoquímica en secciones seriadas de tejidos procedentes de AAA humanos.

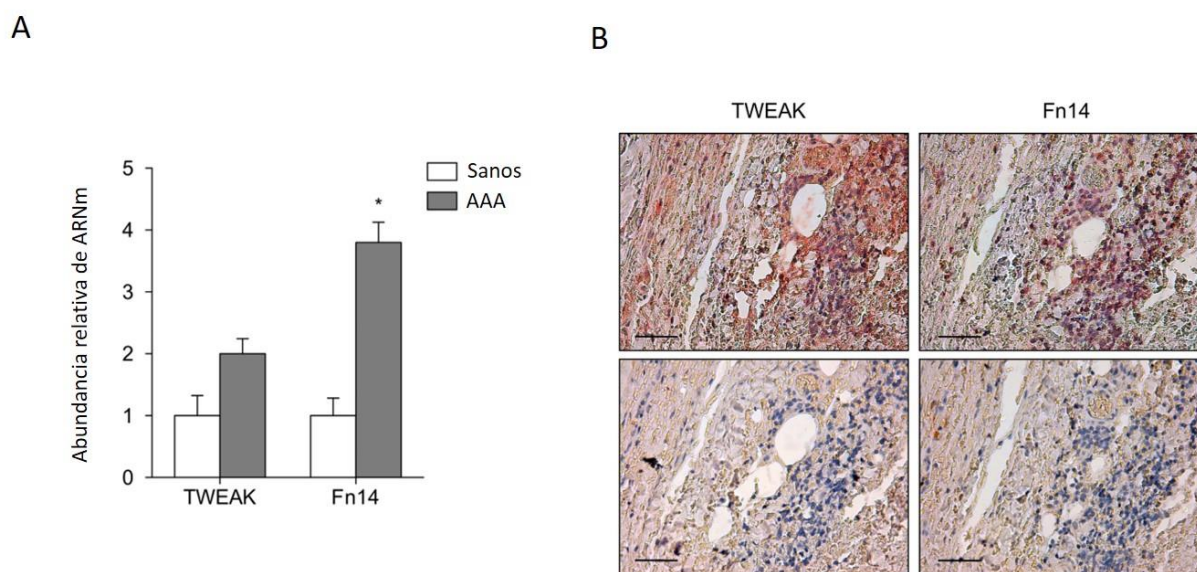


Figura 12. TWEAK y Fn14 se expresan en el AAA humano. A, Análisis de la expresión de RNAm de TWEAK y Fn14 por PCR a tiempo real, procedente de tejido aórtico de individuos sano o pacientes con AAA. Valores expresados como media \pm EEM N=6 por grupo. * $p < 0.005$ vs sujetos sanos. B, Inmunohistoquímicas representativas de TWEAK y Fn14, en cortes seriados de lesiones aneurismáticas humanas. Los controles negativos se incubaron con IgG inespecíficas. Escala, 100 μ m.

1.2. La deficiencia de TWEAK o Fn14 protege del AAA inducido por perfusión con elastasa en ratón.

Para analizar el posible papel que desempeña el eje TWEK/Fn14 en el desarrollo del AAA, realizamos un modelo experimental de inducción de AAA por perfusión de elastasa en ratones deficientes para TWEAK o Fn14 y sus controles salvajes (WT). El desarrollo del AAA se definió como el incremento del 100% del diámetro aórtico. El análisis a los 14 días post-perfusión mostró una disminución significativa del diámetro aórtico en los ratones TWEAK y Fn14 KO en comparación con los animales control. (**Figura 13 A y B**) ($p < 0,01$ para ambos). Mientras que 14 de los 16 animales WT desarrollaron AAA a los 14 días de la intervención (87% de incidencia) solo 1 de 16 en el caso de los TWEK KO y 2 de 15 en el grupo de los deficientes para Fn14 desarrollaron AAA (6% Y 13% de incidencia, respectivamente) ($p < 0,001$ para ambos). El análisis histológico de la región infra-renal de la aorta también evidenció una reducción del grosor intima-media tanto en los ratones KO para TWEAK como para Fn14 al compararlos con sus controles WT (**Figura 13C**). Como un control adicional, se incluyeron animales de cada grupo genético a los que se les realizó el mismo proceso quirúrgico pero sin infundirles elastasa, no encontrándose dilatación aórtica significativa en ninguno de los grupos analizados (**Figura 13 B y C**).

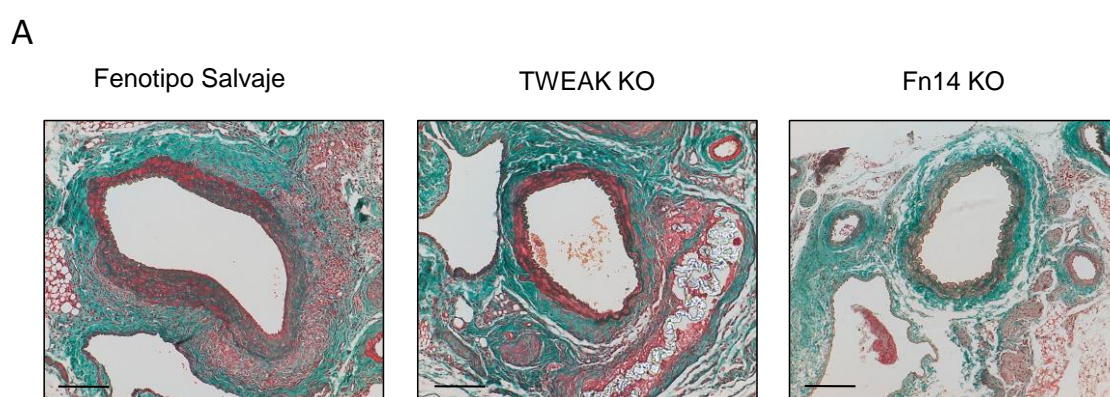


Figura 13: A, La delección de TWEAK o Fn14 disminuye la formación de AAA. A, Tinción representativa de Masson en lesiones de AAA de WT, TWEAK KO y Fn14 KO, 14 días post-perfusión. Escala 100 μ m.

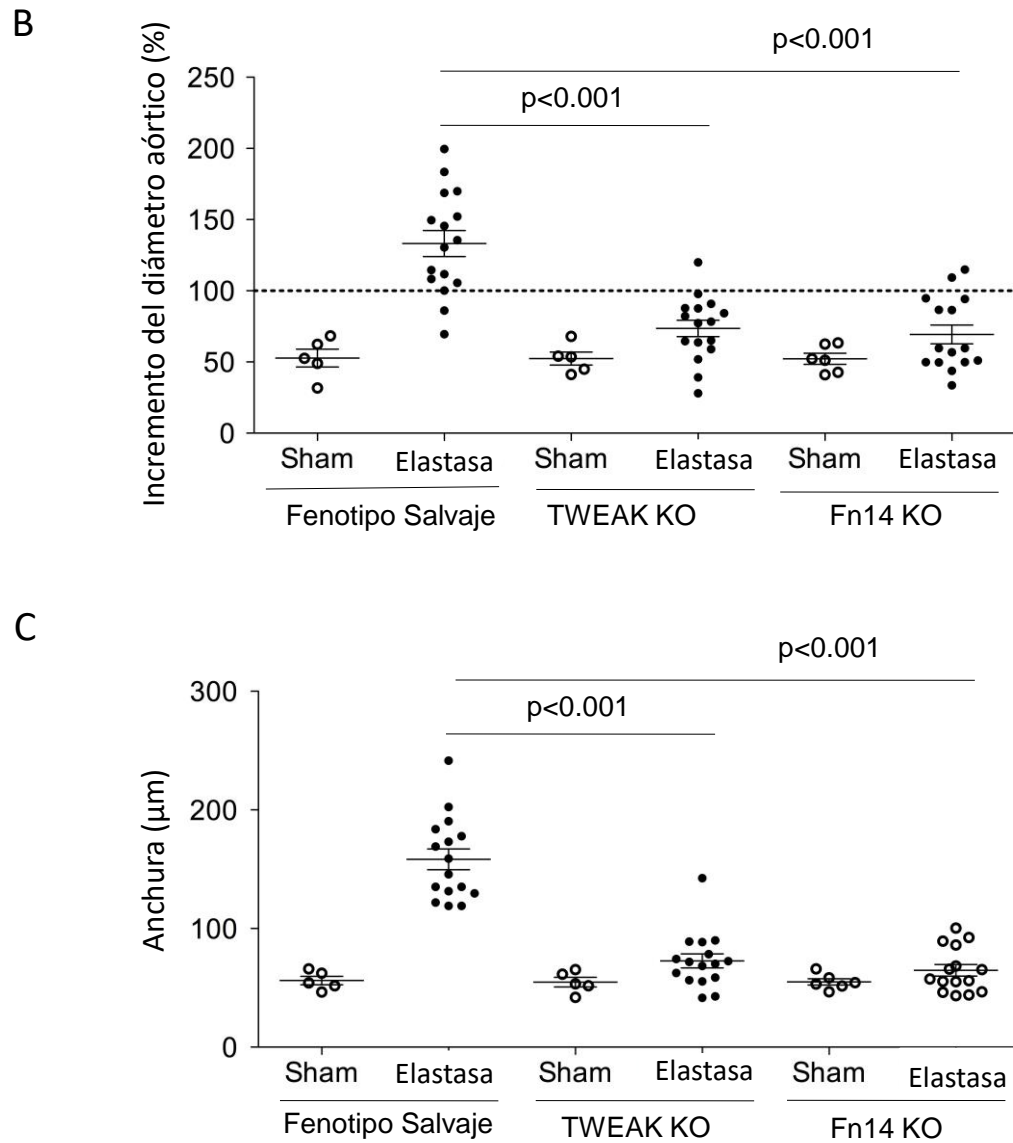


Figura 13 (continuación): La delección de TWEAK o Fn14 disminuye la formación de AAA. B, Incremento del diámetro aórtico en porcentaje y C, grosor intima-media máximo en la pared arterial de ratones a los 14 días post-perfusión con elastasa; WT (N=16), TWEAK KO (N=16), Fn14 KO (N=15) o salino; WT (N=5), TWEAK KO (N=5) y Fn14 (N=6).

1.3. La deficiencia de TWEAK o Fn14 reduce el contenido inflamatorio de la lesión en el AAA.

El infiltrado inflamatorio en las lesiones de aneurismáticas juega un papel destacado en la progresión de la enfermedad (152). La ausencia de TWEAK o su receptor funcional Fn14, provocó una disminución, de monocitos/macrófagos ($p<0,05$ y $p<0,01$, respectivamente) y neutrófilos ($p<0,005$ para ambos genotipos) en las lesiones de AAA, al compararlos con los ratones WT (**Figura 14 Ay B**).

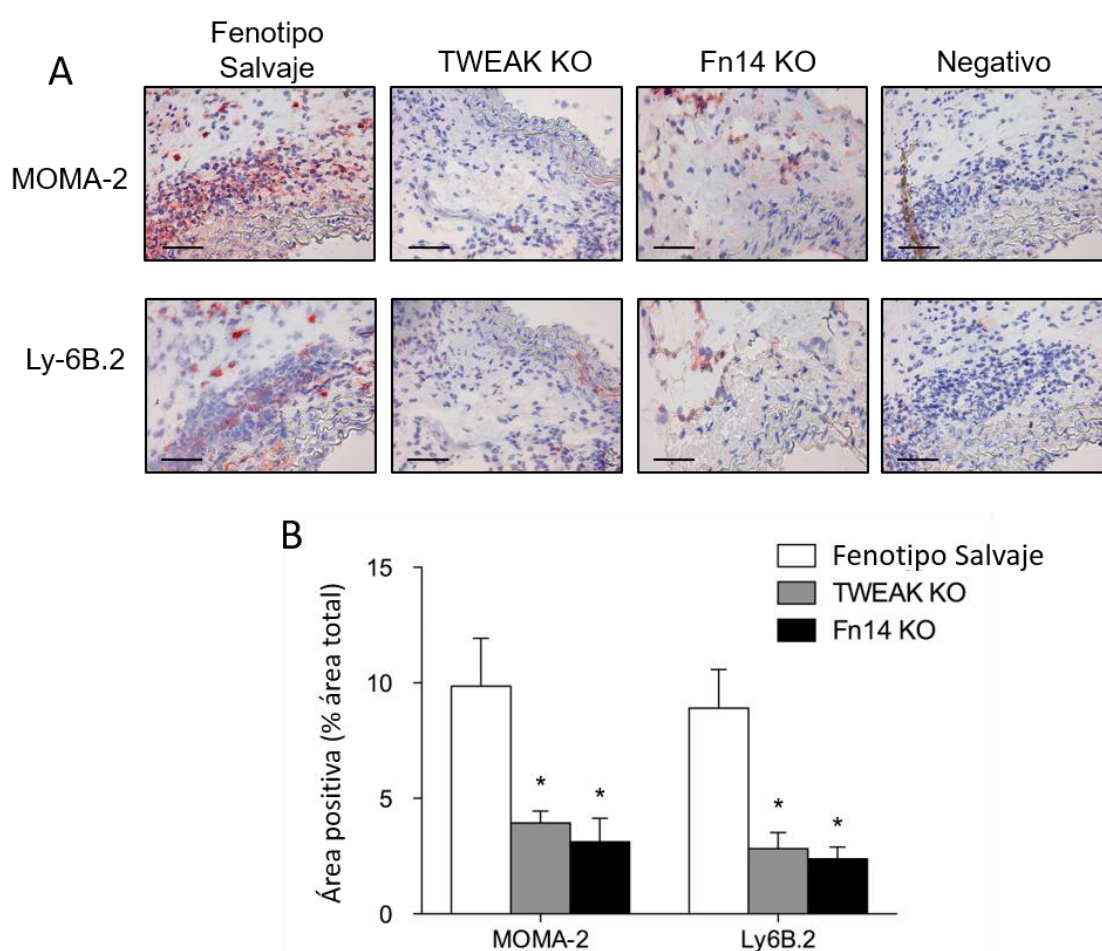


Figura 14. La deficiencia de TWEAK o Fn14 reduce el contenido inflamatorio en el AAA. A, Tinción representativa y B, cuantificación del marcaje positivo de macrófagos por MOMA-2 y de neutrófilos por Ly-6B.2 en lesiones aneurismáticas de ratones TWEAK KO (N=9), Fn14 (N=9) y WT (N=10) a los 14 días post-perfusión. Los valores mostrados se expresan como media \pm EEM. * $P<0.05$ vs WT. Los controles negativos se incubaron con una IgG inespecífica. Escala 50 μ m.

Del mismo modo, se observó, una disminución del número de células T CD3⁺ tanto en los ratones TWEAK KO como en los Fn14 KO, comparados con los WT ($p<0,01$ y $p<0,001$, respectivamente; **(Figura 15)**. La presencia de angiogénesis dentro de la lesión aneurismática juega un papel clave en la progresión y rotura del mismo (153). La reducción del crecimiento y del contenido inflamatorio en los ratones deficientes para TWEAK y Fn14 podría deberse a una disminución en la presencia de neovasos en los AAA. Para estudiar esta hipótesis realizamos una inmunohistoquímica con el marcador de células endoteliales CD31⁺ en secciones aórticas de ratones WT, TWEAK KO y Fn14 KO, comprobando que había una reducción de la presencia de microvasos en los genotipos delecionados, comparándolos con los ratones control ($p<0.001$ y $p<0,05$, respectivamente) **(Figura 15)**.

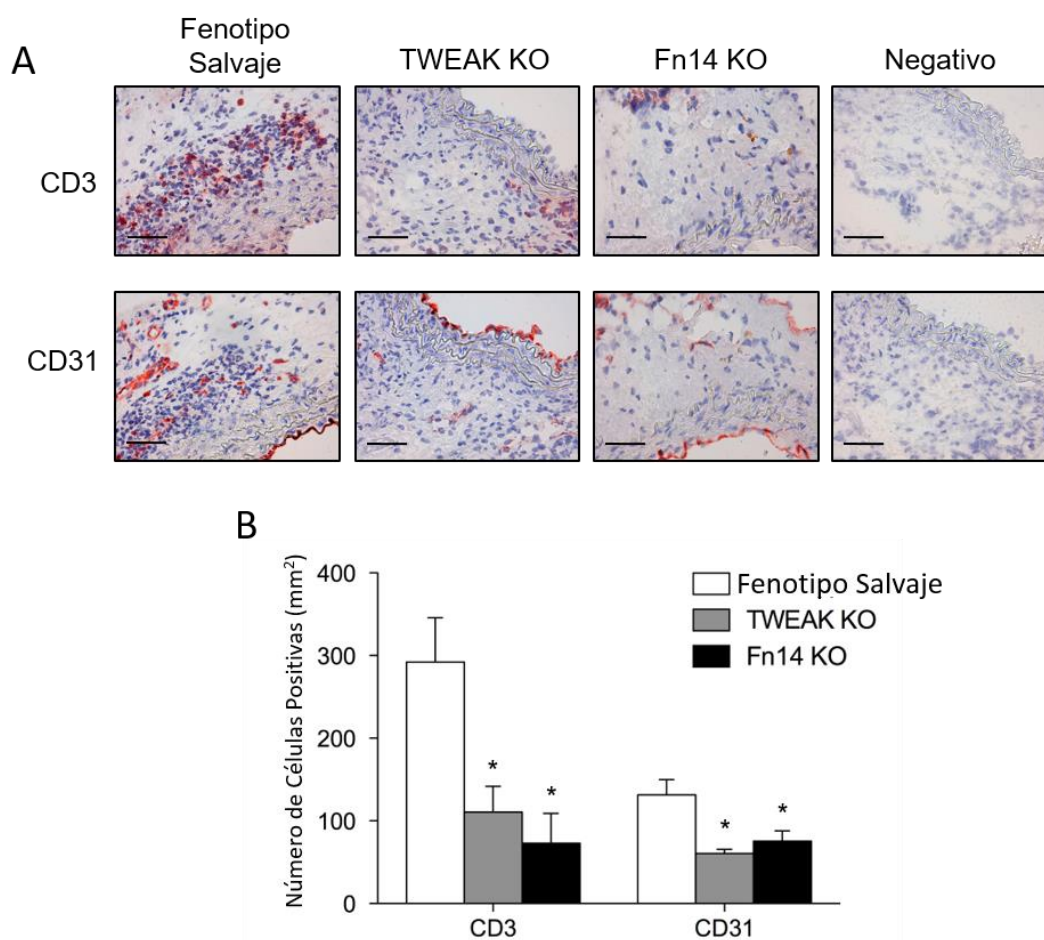


Figura 15. La delección de TWEAK o Fn14 reduce el contenido inflamatorio y la neovascularización en el AAA. A, Tinción representativa y B, cuantificación de células marcadas positivamente para CD3⁺ y CD31⁺ en lesiones de AAA de TWEAK KO (N=9), Fn14 (N=9) y WT (N=10) a los 14 días post-perfusión. Los valores mostrados se expresan como media \pm EEM. * $P<0.05$ vs WT. Los controles negativos se incubaron con una IgG inespecífica. Escala 50 μ m.

La reducción del contenido inflamatorio observado en los ratones deficientes para TWEAK o Fn14 en las lesiones aneurismáticas sugiere que el eje TWEK/Fn14 participa en el reclutamiento de leucocitos o en su proliferación. De hecho, se observó una reducción significativa de las células proliferativas, marcadas con Ki67⁺, en los AAA tanto en ratones TWEAK como Fn14 KO comparados, con ratones WT ($p < 0,005$ para ambos; **(Figura 16)**). La mayoría de las células positivas para Ki67⁺ se localizaron en la capa media.

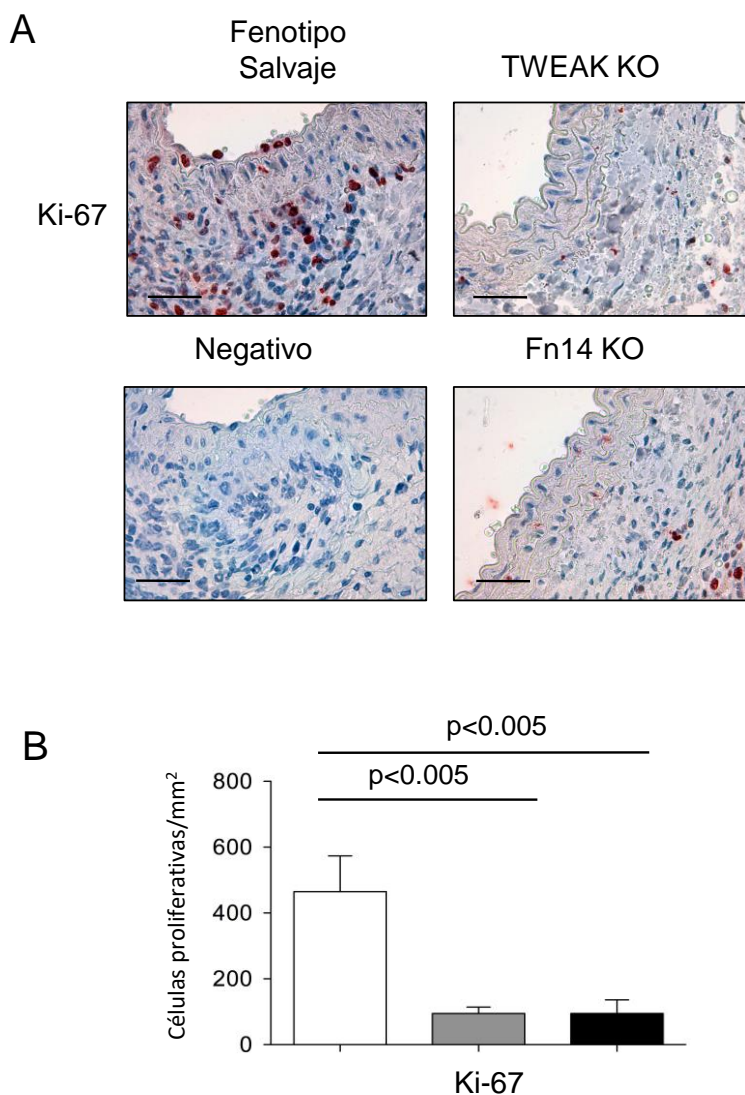


Figura 16. La delección de TWEAK o Fn14 disminuye la proliferación celular en el AAA. A, Tinción representativa y B, cuantificación del marcaje positivo de Ki-67 en lesiones aneurismáticas de ratones TWEAK KO (N=7), Fn14 KO (N=7) and WT (N=7) a los 14 días post-perfusión. Los valores se muestran como la media \pm EEM. * $p < 0.005$ vs WT. Los controles negativos se incubaron con IgGs inespecíficas. Escala 50 μ m.

Diferentes quimioquinas participan en el reclutamiento de células inflamatorias hacia la pared vascular patológica. De hecho, tanto CCL2 como CCL5 participan en el reclutamiento de células inflamatorias tales como monocitos/macrófagos y neutrófilos en el AAA de humanos (154,155). Mediante inmunohistoquímica en las secciones aórticas provenientes de los ratones deficientes para TWEAK o Fn14 observamos una menor expresión de CCL2 y CCL5 comparadas con las secciones aneurismáticas procedentes de ratones WT ($p<0,005$ para todos) (**Figura 17**).

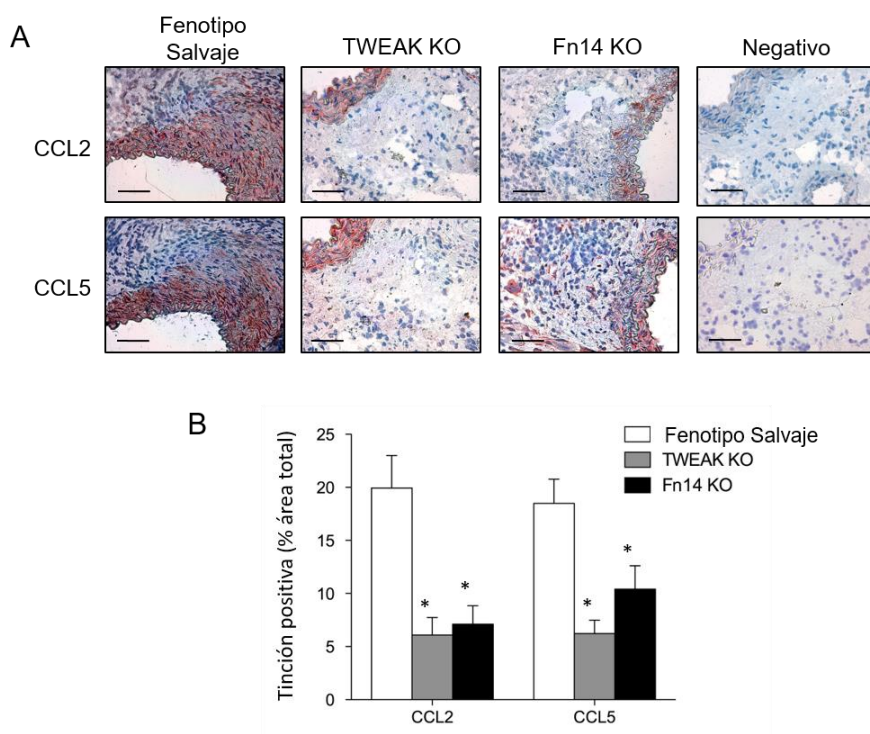


Figura 17. La delección de TWEAK o Fn14 disminuye la expresión de quimioquinas pro-inflamatorias en el AAA. A, Tinción representativa y cuantificación B, del marcaje positivo de CCL2 y CCL5 en AAA de ratones TWEAK KO (N=9), Fn14 KO (N=9) and WT (N=10) a los 14 días post-perfusión. Los valores se muestran como la media \pm EEM. * $p<0.005$ vs WT. Los controles negativos se incubaron con IgGs inespecíficas. Escala 50 μ m.

Para confirmar el efecto directo de TWEAK en la expresión proteica de CCL2 y CCL5, se cultivaron CMLV y BMDM en presencia o ausencia de TWEAK recombinante de ratón (de 0,01 a 0,1 μ g/ml) durante 24h y se analizó la secreción de CCL2 y CCL5 mediante un ensayo de ELISA. TWEAK incrementó la expresión de ambas citoquinas en CMLV (Figura 18). Sin embargo, en BMDM solo se observó el aumento de expresión de CCL5, de forma dosis dependiente ($p<0,01$ vs basal, en todos los casos) (**Figura 18**). El aumento de la secreción de CCL2 y CCL5 inducida por TWEAK es un efecto directo relacionado con la presencia de su receptor funcional

Fn14 ya que TWEAK no fue capaz de modificar la expresión de CCL2 ni de CCL5 en CVML o BMDM en ausencia de Fn14 (células procedentes de ratones deficientes para Fn14) (**Figura 18**).

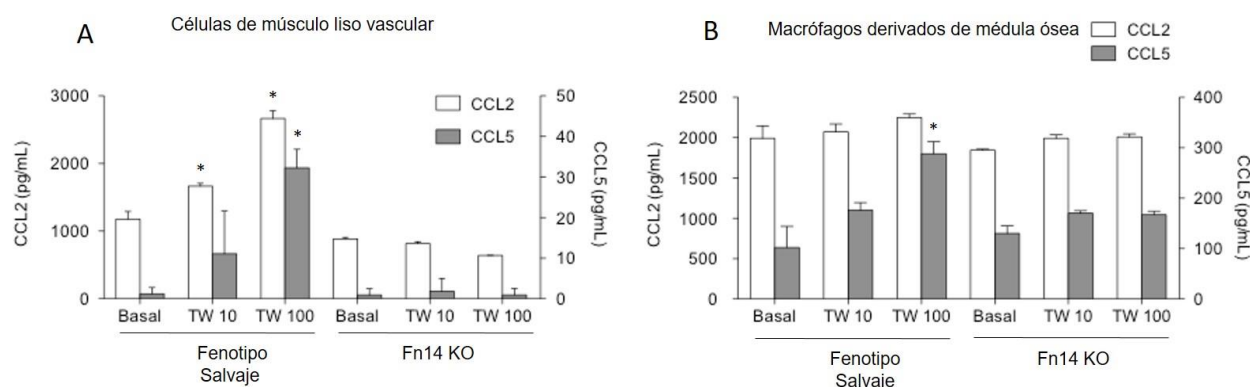


Figura 18. La delección de TWEAK o Fn14 disminuye la expresión de quimioquinas pro-inflamatorias in vitro. A y B. Efecto de TWEAK en la secreción de CCL2 and CCL5 en CMLV y BMDM en cultivo. Las células provenientes de ratones WT o Fn14 KO se incubaron con 0.01-0.1 µg/mL de TWEAK durante 24 horas y los sobrenadantes se analizaron mediante ELISA de CCL2 o CCL5. Los valores se muestran como la media ± EEM. E, * $p < 0.005$ vs basal. F* $p < 0.01$ vs basal.

Estos resultados sugieren que la reducción del contenido de macrófagos, neutrófilos y linfocitos CD3⁺ en las lesiones aneurismáticas de los ratones TWEAK y Fn14 KO podría deberse a una disminución en la secreción de moléculas quimioattractantes, dando lugar a una reducción del reclutamiento inflamatorio, una angiogénesis disminuida y/o una menor proliferación celular.

1.4. La deficiencia de TWEAK o Fn14 reduce la apoptosis de células vasculares.

La pérdida de densidad de CMLV en la capa media es una característica del AAA humano y está relacionado con la disrupción de la elastina en la túnica media. En nuestro modelo experimental observamos, mediante inmunohistoquímica de α -actina, una profunda desorganización de la capa media en los cortes provenientes de animales WT comparados con los procedentes de ratones deficientes para TWEAK o Fn14 (**Figura 19**). Del mismo modo, la pérdida de las CMLV se vió reducida de forma significativa en los ratones TWEAK o Fn14 KO, comparados con los WT ($p < 0,01$ para ambos) (**Figura 19 B**).

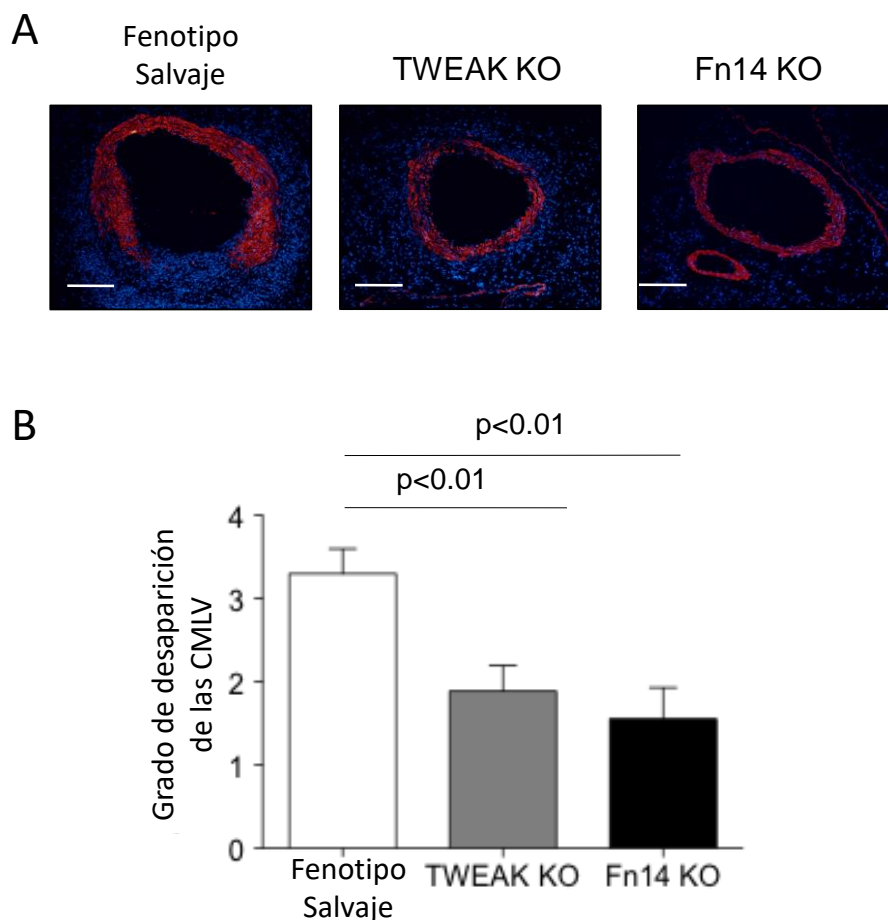


Figure 19. La deficiencia de TWEAK o Fn14 reduce la pérdida de CMLV en el AAA. A, Tinción representativa de α -actina (rojo) en AAA procedentes de WT, TWEAK KO y Fn14 KO a los 14 días post-perfusión. Los núcleos se contratiñeron con DAPI (azul). Escala, 100 μ m. B, Clasificación de la preservación de CMLV (puntuaciones más altas indican mayor irregularidad y pérdida de celular) en ratones TWEAK KO (N=9), Fn14 KO (N=9) y WT (N=10) a los 14 días post-perfusión. Los valores se muestran como la media \pm EEM.

Debido a que la muerte celular programada o apoptosis puede contribuir a la pérdida de CMLV de la capa media (156), analizamos la contribución del eje TWEAK/Fn14 en la apoptosis de CMLV en las lesiones aneurismáticas mediante tinción de TUNEL en secciones aórticas procedentes de ratones WT, TWEAK KO y Fn14 KO. Se observó una reducción de las células positivas para TUNEL en la pared aórtica completa como en la capa media (principalmente CMLV), en los ratones deficientes para TWEAK o Fn14 comparados con los animales WT (**Figura 20 A y B**). Para confirmar estos resultados realizamos además una inmunohistoquímica de PARP cortada (marcador de activación de apoptosis) en las secciones aórticas de todos los grupos de estudio, corroborando una menor presencia de marcaje

positivo tanto en la pared como en la media de los cortes procedentes de ratones deficientes para TWEAK o Fn14, en comparación con los procedentes de animales WT (**Figura 20 B y C**).

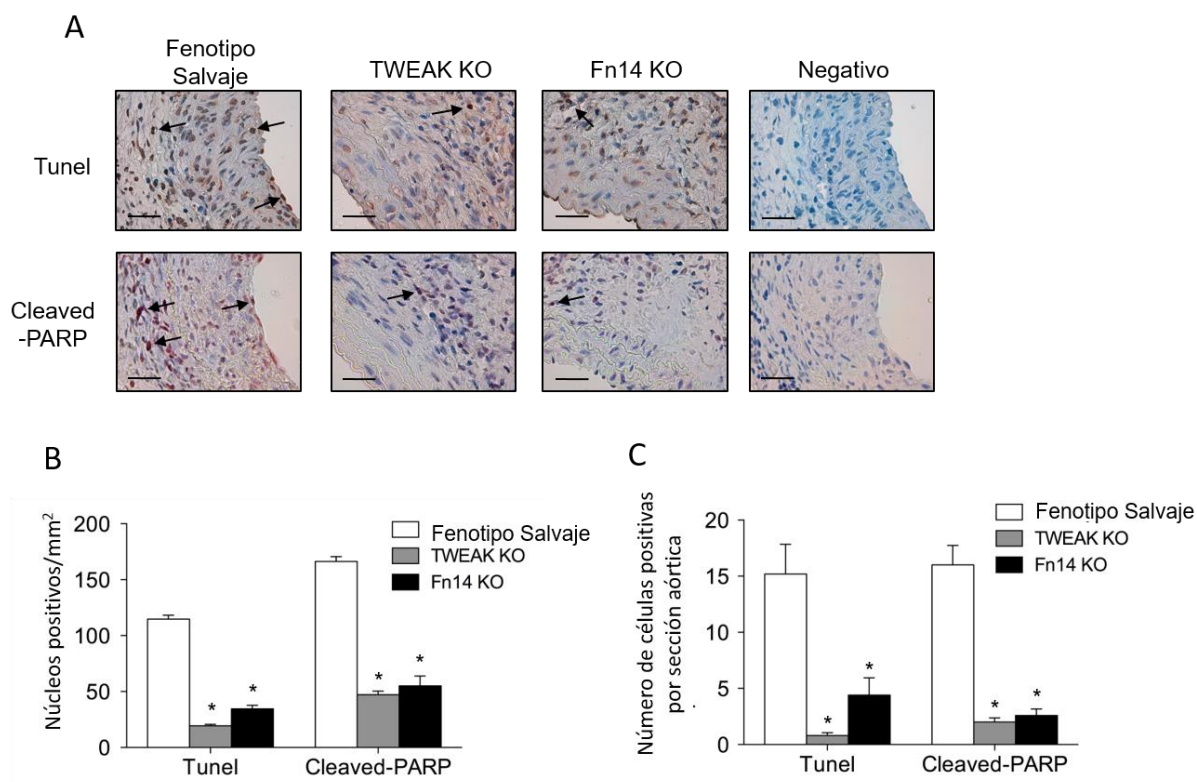


Figura 20. La deficiencia de TWEAK o Fn14 reduce la apoptosis en el AAA experimental. A Tinción representativa de TUNEL⁺ y cleaved-PARP⁺ en AAA de ratones WT, TWEAK KO y Fn14 KO a los 14 días post-perfusión. Las flechas señalan las células marcadas positivamente. Escala, 50 μ m. Los controles negativos se incubaron con IgGs inespecíficas para cleaved-PARP o en ausencia de TdT en el TUNEL. B, Cuantificación del marcaje positivo de células/mm² C, o por número de células/sección en ratones WT (N=7), TWEAK KO (N=7) y Fn14 (N=7 a los 14 días post-perfusión. Los valores se muestran como la media \pm EEM. * $p < 0.05$ vs control.

Para analizar la contribución de TWEAK en la viabilidad de las CMLV en cultivo, CMLV se incubaron en presencia de concentraciones crecientes de TWEAK durante 18 horas. Como se puede observar en la **figura 21**, TWEAK no fue capaz de disminuir la viabilidad de CMLV en cultivo. Es conocido que la elastasa es capaz de inducir muerte celular en CMLV (157). Como era de esperar, la elastasa disminuyó la viabilidad de las CMLV de una manera dosis dependiente en nuestras condiciones experimentales (**Figura 21**).

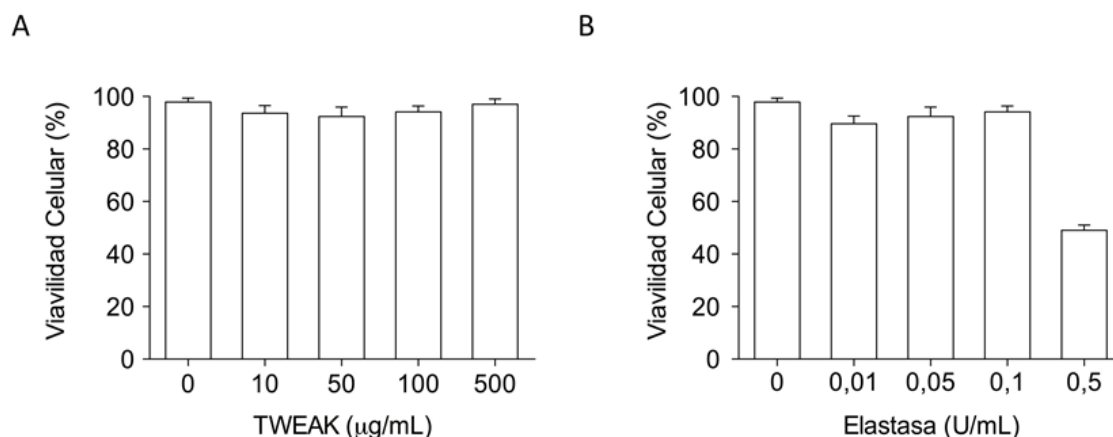


Figura 21. Efecto de TWEAK y elastasa sobre la viabilidad de CMLV en cultivo. A, Efecto de TWEAK en la viabilidad de las CMLV. Las células procedentes de ratones WT se incubaron con concentraciones crecientes de TWEAK recombinante o elastasa (0.01-0.5 U/mL) durante 18 horas. El número de células se midió mediante la incorporación de Azul de Metileno. Los valores representan el porcentaje de células viables respecto a su control. Los valores se muestran como la media \pm EEM. * $p < 0.05$ vs control.

Con el fin de analizar si podría existir un efecto aditivo entre TWEAK y elastasa sobre la muerte celular de CMLV en cultivo, seleccionamos la máxima concentración de elastasa incapaz de inducir apoptosis (0,1 U/mL) y la combinamos con concentraciones crecientes de TWEAK recombinante. Como se observa en la **figura 22** TWEAK disminuyó la viabilidad de las CMLV en presencia de dosis no letales de elastasa. Este efecto fue dependiente de la expresión de Fn14, ya que TWEAK no modificó la viabilidad de las CMLV procedentes de ratones deficientes para Fn14 (**Figura 22**). Estos resultados, indican que TWEAK juega un papel importante en la viabilidad celular en presencia de proteasas.

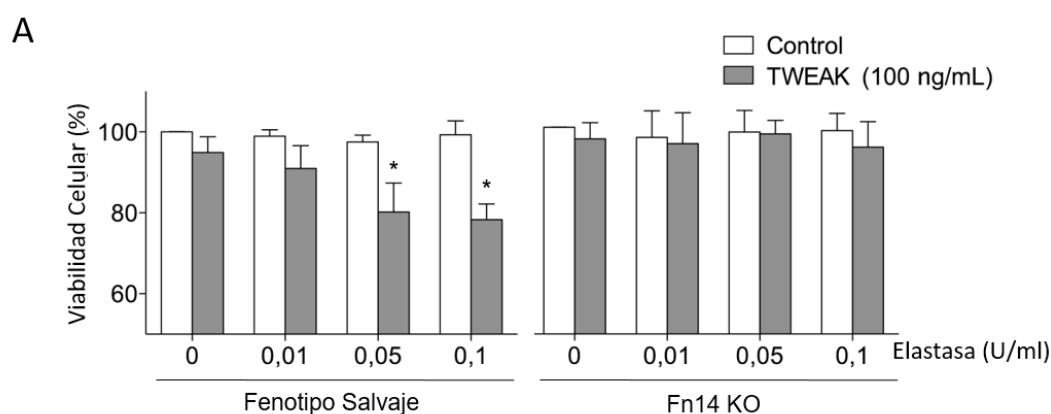


Figura 22 TWEAK disminuye la viabilidad de las CMLV in vitro en presencia de proteasas F. Efecto de TWEAK en la viabilidad de las CMLV. Las células procedentes de ratones WT o Fn14 KO se incubaron con 100 ng/mL de TWEAK recombinante en ausencia o presencia de elastasa (0.01-0.5 U/mL) durante 18 horas. El número de células se midió mediante la incorporación de Azul de Metileno. Los valores representan el porcentaje de células viables respecto a su control. Los valores se muestran como la media \pm EEM. * $p < 0.05$ vs control.

1.5. El eje TWEAK/Fn14 participa en la degradación de la elastina en el AAA experimental

La fragmentación de la elastina de la media es un mecanismo crucial implicado en el desarrollo del AAA (158). La tinción de Verhoeff-van Gieson, en los cortes procedentes de nuestro modelo experimental, mostró una reducción de la fragmentación de la elastina en las lesiones aneurismáticas procedentes de ratones deficientes para TWEAK o Fn14 respecto a sus controles WT (**Figura 23**).

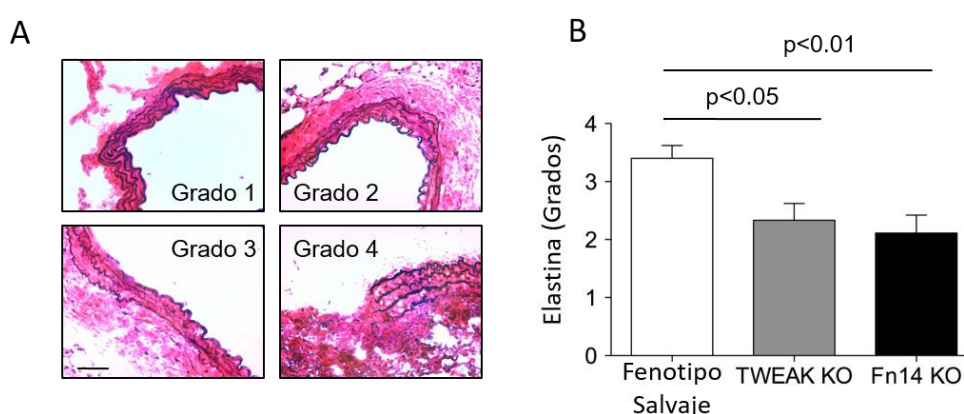


Figura 23. La deficiencia de TWEAK o Fn14 disminuye la degradación de la elastina en el AAA. A, Tinción representativa de Verhoeff-van Gieson, mostrando los 4 grados en los que se clasifica la degradación de la elastina. Escala 50 μ m. B, Cuantificación de la degradación de la elastina de la media en ratones WT (N=10), TWEAK KO (N=9) y Fn14 KO (N=9). Los valores se muestran como la media \pm EEM.

También analizamos la actividad de las MMPs *ex vivo* con un agente activable por proteasas que emite una señal fluorescente (MMPsense 680) capaz de ser detectada usando Tomografía de Fluorescencia Molecular (FMT). La sonda MMPsense 680 se activa por la acción de las MMPs 2-3-9 y 13. La **Figura 24 A** es una representación en 2D de la fluorescencia derivada de la activación de la sonda en animales WT, TWEAK KO y Fn14 KO, tras la inducción experimental del AAA. Detectamos una clara señal fluorescente en la región de desarrollo del AAA en el ratón WT (**Figura 24 B**). Las aortas de los ratones TWEAK KO Y Fn14 KO, mostraron una actividad MMP reducida comparada con la del ratón WT ($p<0,05$ y $p<0,01$, respectivamente) (**Figura 23 B**). Además, confirmamos mediante zimografía en gel de gelatina que tanto la actividad de MMP-3 como la de MMP-9 eran menores en la pared del AAA de los animales deficientes para TWEAK o Fn14 que la que presentaban los ratones WT (**Figura 24 C**). No se observó actividad MMP en la aorta torácica en ninguno de los grupos de estudio.

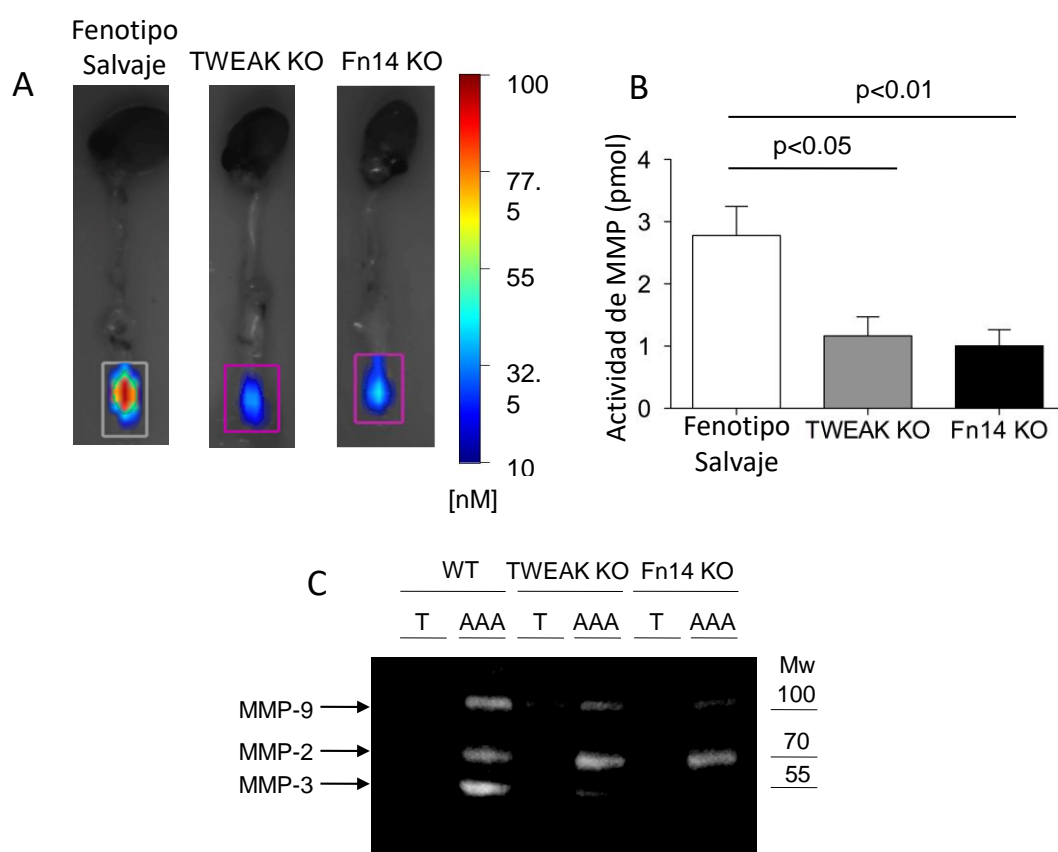


Figura 24. La deficiencia de TWEAK o Fn14 disminuye la actividad MMP en el AAA experimental. A, Imágenes representativas de FMT *ex vivo* y B, cuantificación de la fluorescencia emitida por la sonda MMPsense680 en ratones WT (N=6), TWEAK KO (N=6) y Fn14 KO (N=6). Las imágenes se tomaron 24h después de la inyección de la sonda. Los valores se muestran como la media \pm EEM. C, Zimografía en gel de gelatina para detectar la actividad MMP en tejidos procedentes de AAA y aortas torácicas (T) de ratones WT, TWEAK KO, Fn14 KO.

Para confirmar un efecto directo de TWEAK en la expresión de MMP, cultivamos CMLV y BMDM en ausencia o presencia de TWEAK (100 ng/ml), analizando posteriormente el RNAm de MMP-2,-3,-9 y 13. TWEAK incrementa la expresión de RNAm de MMP9, pero no de MMP-2,-3 ni 13 en CMLV procedentes de ratones WT ($p<0,01$ vs control; **Figura 25 A**). En el caso de las BMDM, TWEAK incrementaba la expresión de MMP-3 y MMP-9 en células procedentes de ratones WT ($p<0,05$ vs control para ambas) (**Figura 26 A**). Además, este efecto es dependiente de la presencia de su único receptor funcional, ya que TWEAK no modifica la expresión de RNAm de estas metaloproteinasas en ninguno de los dos tipos celulares, cuando provenían de ratones deficientes para Fn14 (**Figura 25A y 26 A**) El ensayo de zimografía en gel de gelatina mostró un aumento en la actividad de MMP-9 en los sobrenadantes procedentes de CMLV o BMDM de ratones WT, pero no de ratones deficientes para Fn14, incubadas en presencia de TWEAK. Sin embargo, no se observó un aumento en la actividad de MMP-2 o -3 tras estimulación con TWEAK (**Figura 25 B y C y 26 B y C**).

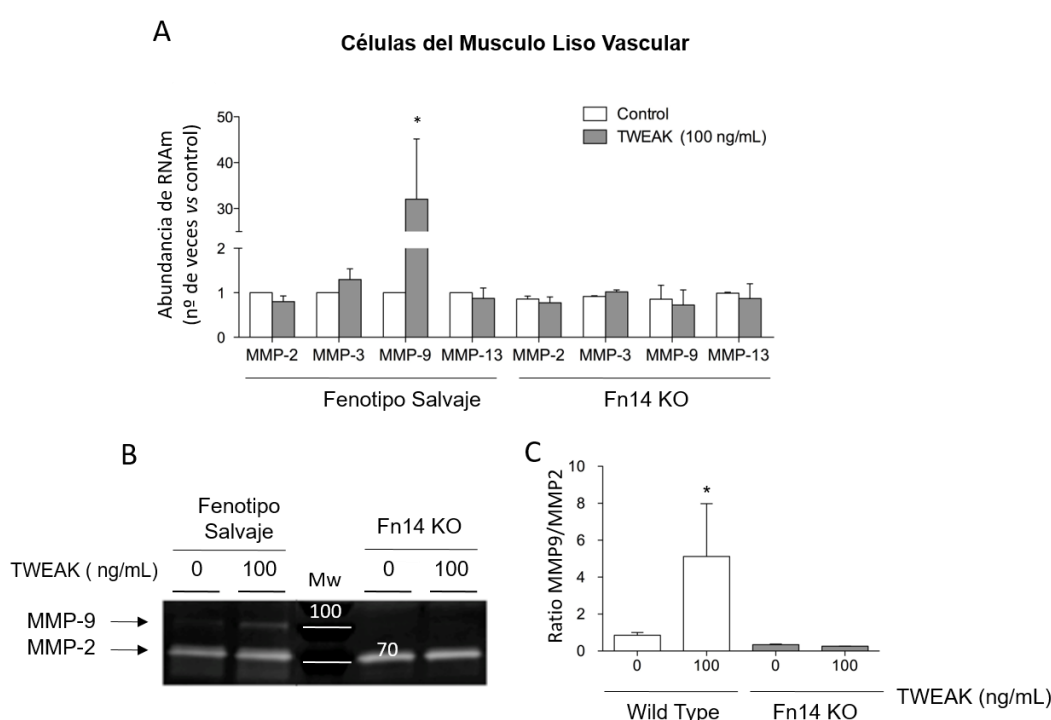


Figura 25. TWEAK incrementa la expresión de MMP-9 y su actividad en CMLV. A, Análisis de PCR a tiempo real de MMP-2,-3,-9 y-13 en CMLV de ratones WT y Fn14 KO. Los valores se muestran como la media \pm EEM de 3 experimentos independientes. B, Zimografía en gel de gelatina para detectar la actividad MMP en los sobrenadantes de CMLV procedentes ratones WT o Fn14 en ausencia o presencia de TWEAK (100 ng/ml). C, Análisis densitométrico de la actividad de las MMPs en CMLV. Los valores se muestran como la media \pm EEM de 3 experimentos independientes ($p<0,05$ vs control).

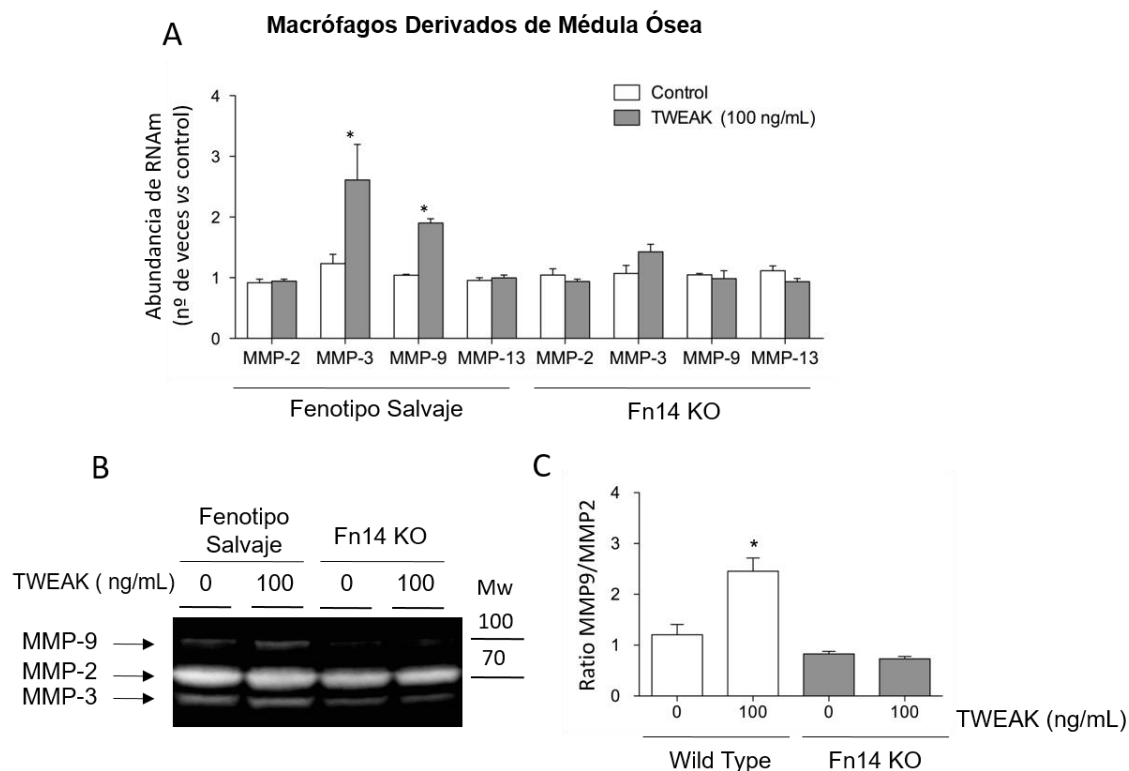


Figura 26. TWEAK incrementa la expresión de MMP 9 y su actividad en BMDM. A, Análisis de la PCR a tiempo real de MMP-2,-3,-9 y -13 en BMDM de ratones WT y Fn14 KO. Los valores se muestran como la media \pm EEM de 4 experimentos independientes. B, Zimografía en gel de gelatina para detectar la actividad MMP en los sobrenadantes de BMDM procedentes ratones WT o Fn14 en ausencia o presencia de TWEAK (100 ng/ml). C, Análisis densitométrico de la actividad de las MMPs en CMLV. Los valores se muestran como la media \pm EEM de 4 experimentos independientes, ($p < 0,05$ vs Ausencia de TWEAK).

Finalmente, y mediante inmunohistoquímica comprobamos que tanto TWEAK como Fn14 colocalizaban con MMP9 en muestras de AAA humano (**Figura 27**).

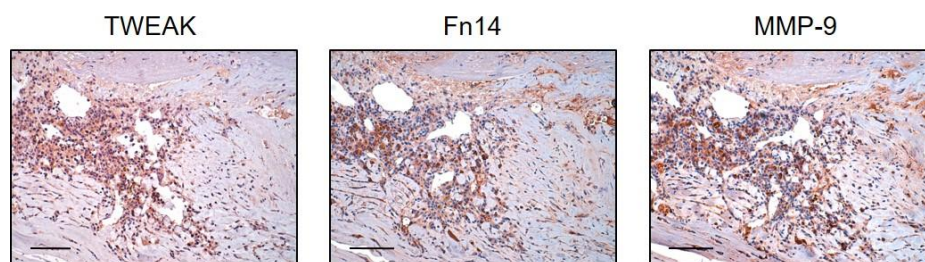


Figura 27. TWEAK y Fn14 colocalizan con MMP9. Tinción representativa de TWEAK, Fn14 y MMP9 en muestras de AAA humano.

2. El bloqueo de TWEAK disminuye el tamaño y la progresión de la lesión aterosclerótica debido a la supresión de la vía de señalización de STAT en los ratones diabéticos.

2.1 La deficiencia de TWEAK reduce la carga aterosclerótica y el tamaño de la placa en el ratón ApoE diabético.

Para analizar el efecto de la delección de TWEAK en la aterosclerosis acelerada por diabetes, realizamos un modelo experimental de diabetes en ratones doble deficientes para TWEAK y ApoE y sus respectivos controles deficientes para ApoE de 16 semanas de edad a los que se les inyectó estreptozotocina durante dos días consecutivos (159). Los ratones se sacrificaron tras 10 semanas de seguimiento. No se observaron diferencias significativas en peso (**Figura 28 A**) ni concentración de glucosa entre los dos genotipos diabéticos durante el seguimiento del modelo experimental (**Figura 28B**). Tampoco se encontraron diferencias significativas, en los diferentes parámetros bioquímicos analizados al final del seguimiento del modelo como son las concentraciones en ayunas de glucosa, colesterol, HDL-c, LDL-c o triglicéridos en los ratones de los distintos grupos genéticos (**Figura 28 C y D**). No hubo diferencias en el peso o las concentraciones lipídicas entre los ratones diabéticos y no diabéticos (**Figura 28 D**). Como era de esperar los ratones diabéticos mostraron unas concentraciones de glucosa elevadas respecto a los ratones control no diabéticos.

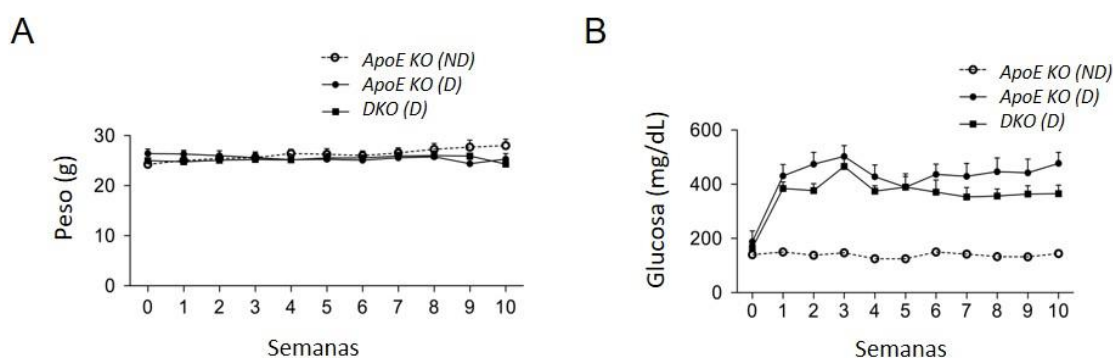


Figura 28 La deficiencia de TWEAK no altera el peso ni las concentraciones lipídicas de los ratones ApoE diabéticos. A, Peso medio B, y niveles de glucosa de todos los animales incluidos en cada grupo durante las 10 semanas del estudio.

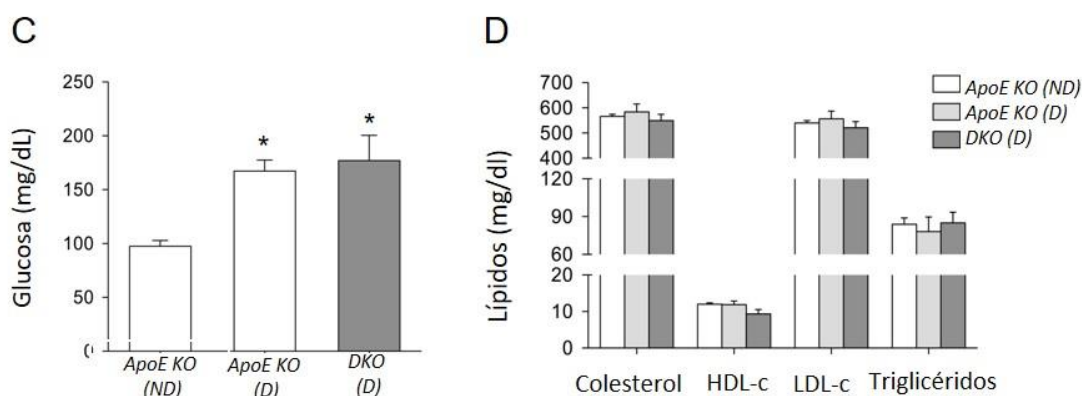


Figura 28 (continuación). La deficiencia de TWEAK no altera el peso ni las concentraciones lipídicas de los ratones ApoE diabéticos. C, Niveles de glucosa medios y D, concentraciones lipídicas por grupo en ayunas. ND=no diabéticos y D=ratones diabéticos. Resultados expresados como media \pm EEM de los ratones Ratones deficientes para ApoE (ND; N=7); Ratones deficientes para ApoE(D; N=12) y Ratones deficientes para TWEAK(D; N=12). * $p<0.05$ vs Ratones deficientes para ApoE(ND).

El análisis de la aorta teñida con Sudan IV mostró una reducción del 67% de la carga aterosclerótica (área de lesión) en los ratones diabéticos doble deficientes respecto a sus controles ($p<0,05$) (**Figura 29 Ay B**). Los ratones deficientes para ApoE diabéticos mostraron un incremento del 164% en el área de lesión al compararlos con sus homólogos no diabéticos (**Figura 29 A y B**). No observamos diferencias en el área de lesión entre los ratones diabéticos doble deficientes y los ratones control no diabéticos (**Figura 29 Ay B**). Teniendo en cuenta que tanto el arco aórtico como la arteria braquiocefálica son nichos propensos a desarrollar placas ateroscleróticas, analizamos el tamaño de las lesiones en estas dos regiones. Los ratones diabéticos doble deficientes presentaron una reducción significativa del tamaño de la lesión en el arco aórtico comparados con sus controles diabéticos (57% de reducción; media del área de máxima lesión ($p<0.001$) (**Figura 29 C-F**). Los ratones deficientes para ApoE no diabéticos también mostraron una reducción significativa del tamaño de las placas ateroscleróticas del arco aórtico, respecto a sus homólogos diabéticos (54% de reducción; media del área de máxima lesión ($p<0.001$) (**Figura 29 C-F**). No observamos diferencias entre los ratones control no diabéticos y los ratones TWEAK KO diabéticos (**Figura 29C-F**).

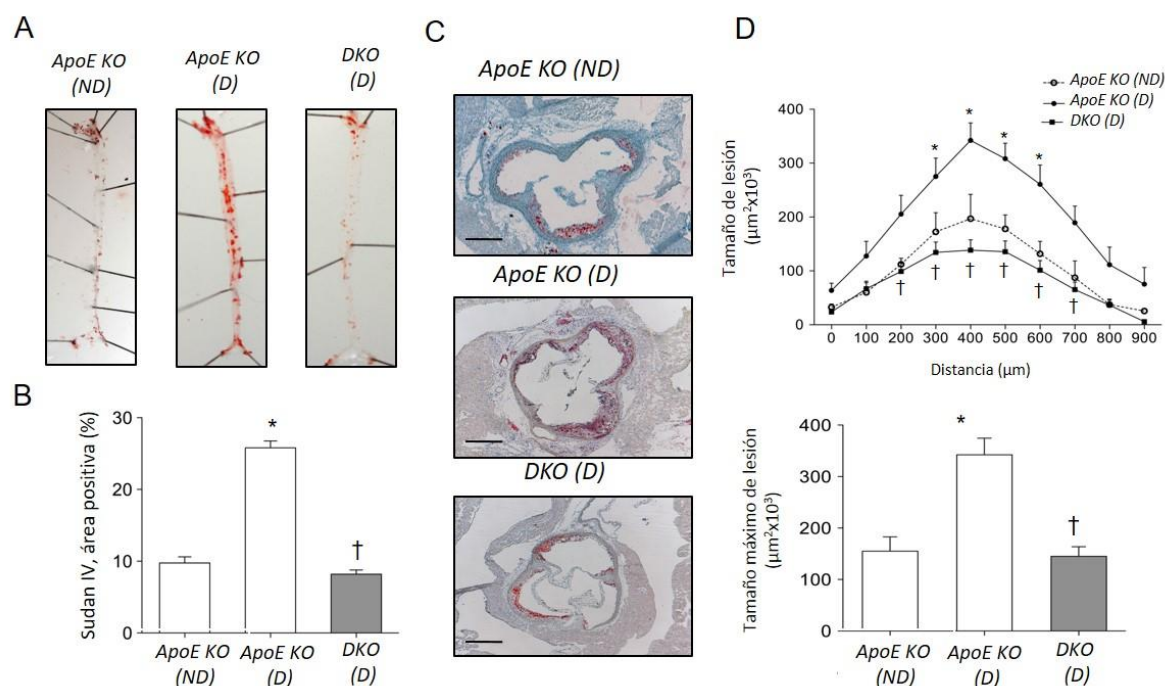


Figura 29: La deficiencia de *Tnfsf12* reduce el daño vascular en el arco aórtico de los ratones *ApoE* diabéticos. A, Imágenes representativas de aortas completas teñidas con Sudan IV y B, cuantificación de las lesiones correspondientes. Los valores se muestran como la media \pm EEM (N=5 por grupo). * $p < 0.001$ vs Ratones deficientes para *ApoE*(ND). † $p < 0.001$ vs Ratones deficientes para *ApoE*(D). C, Imágenes representativas de Oil-Red-O/Hematoxilina y D, cuantificación del área de lesión a lo largo del arco aórtico de los ratones del modelo. Los valores se muestran como la media \pm EEM de Ratones deficientes para *ApoE*(ND; N=7), Ratones deficientes para *ApoE*(D; N=12) y Ratones deficientes para *TWEAK*(D; N=12). * $p < 0.05$ vs Ratones deficientes para *ApoE*(ND). † $p < 0.01$ vs Ratones deficientes para *ApoE*(D). Escala, 200 μ m. F, Media de la lesión máxima por grupo en el arco aórtico de los ratones. Los valores se muestran como la media \pm EEM de Ratones deficientes para *ApoE*(ND; N=7); Ratones deficientes para *ApoE*(D; N=12) y Ratones deficientes para *TWEAK*(D; N=12). * $p < 0.001$ vs Ratones deficientes para *ApoE*(ND). † $p < 0.001$ vs Ratones deficientes para *ApoE*(D).

También se observó una reducción del tamaño de la lesión y la oclusión luminal en la arteria braquiocefálica de los ratones deficientes para *TWEAK* diabéticos respecto a sus controles (84% y 71% respectivamente) (**Figura 30**). Los ratones control no diabéticos no desarrollaron placas ateroscleróticas en sus arterias braquiocefálicas a las 26 semanas de edad.

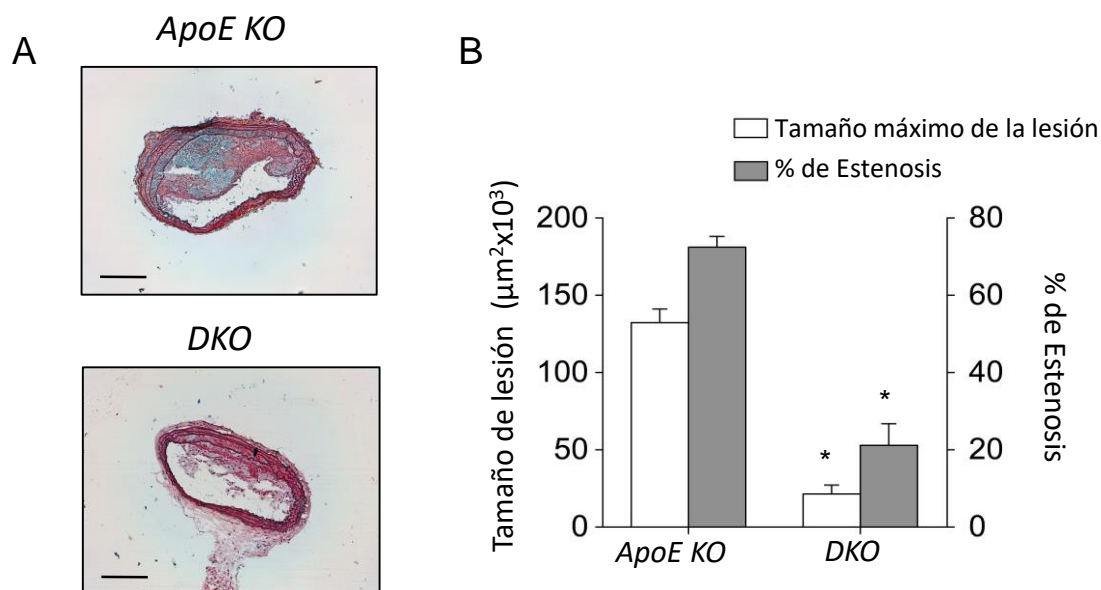


Figura 30. La deficiencia de TWEAK reduce el daño vascular en la arteria braquiocefálica de los ratones ApoE diabéticos. A, Imágenes representativas de secciones de la arteria braquiocefálica procedentes de los distintos grupos de estudio teñidas con pentacrómico de Movat y B, media del área de máxima lesión y porcentaje de oclusión luminal en la arteria braquiocefálica. Los valores se muestran como la media \pm EEM de ratones control (D; N=12) y ratones deficientes para TWEAK (D; N=12) * $p < 0.001$ vs control.

2.2 La deficiencia de TWEAK disminuye la progresión de la placa en el ratón diabético ApoE.

Mientras las fibras de colágeno estabilizan las placas, los depósitos lipídicos promueven la vulnerabilidad de las mismas, haciéndolas más propensas a la rotura (160). En nuestro modelo animal, el contenido lipídico, determinado por la tinción de Oil-Red, fue un 40% menor en los ratones deficientes para TWEAK, comparados con sus controles (**Figura 29C, y Figura 30B**; $p < 0,01$). Sin embargo, el contenido de colágeno, determinado por la tinción de Rojo Sirio, fue similar en ambos genotipos (**Figura 31 A y B**). En consecuencia, el cociente colágeno/lípidos, un marcador de estabilidad de la placa aterosclerótica, se incrementó de forma significativa en los dobles deficientes, comparados con sus controles (**Figura 30 C**).

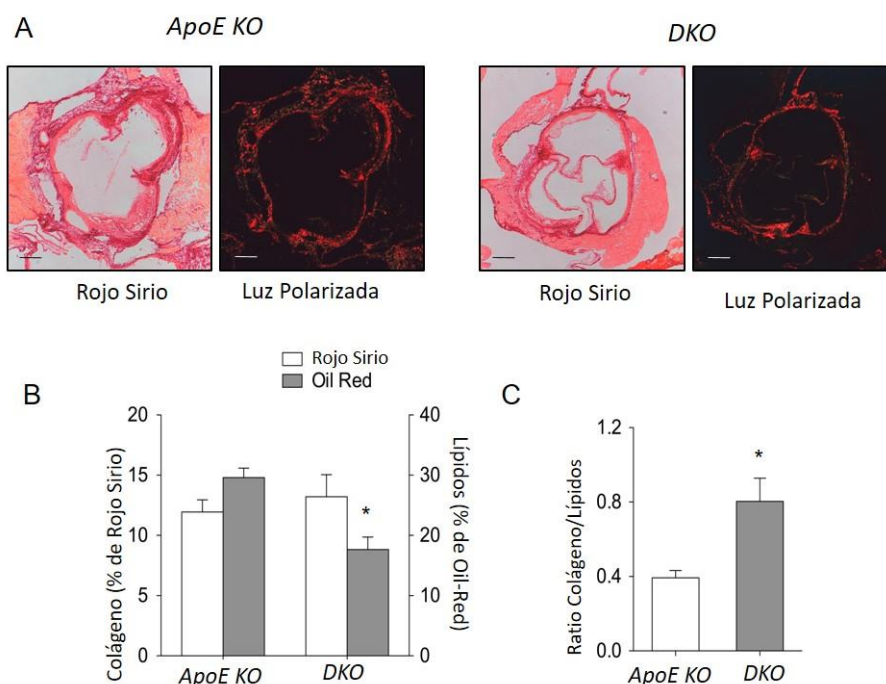


Figura 31. La deficiencia de TWEAK aumenta la estabilidad de la placa aterosclerótica en el ratón ApoE diabético. A, Imágenes representativas de rojo sirio y B, cuantificación de Rojo Sirio y Oil-Red-O en el arco aórtico de los ratones diabéticos. Los valores se muestran como la media \pm EEM de los ratones control (D; N=12) y ratones deficientes para TWEAK (D; N=12) * $p < 0.001$ vs control. Escala, 200 μ m. C) La estabilidad de la placa se evaluó mediante el cociente colágeno/lípidos. * $p < 0.01$ vs control.

Teniendo en cuenta que la inflamación juega un papel crítico, en el desarrollo y progresión y estabilidad de la lesión aterosclerótica determinamos la presencia de macrófagos y CMLV en el arco aórtico de los ratones doble deficientes diabéticos y sus correspondientes controles. Comprobamos que existía una reducción del contenido de células positivas para CD68 en los ratones doble deficientes respecto a sus controles (32% de reducción; $p < 0,05$). Sin embargo, el porcentaje de CMLV fue similar en ambos genotipos (**Figura 32 A-C**). El cociente CMLV/macrófagos, otro marcador de estabilidad de la placa aterosclerótica, se incrementó de forma significativa en los ratones deficientes para TWEAK respecto a sus controles. Estos datos indican que la deficiencia de TWEAK podría incrementar la estabilidad de las placas ateroscleróticas.

Para analizar el efecto de la deficiencia de TWEAK sobre la progresión de la aterosclerosis en los ratones diabéticos utilizamos el método Stary, que clasifica las lesiones en base a su composición histológica y estructural (161): Grado I, placas tempranas que sólo contienen macrófagos; Grado II, lesiones que contienen macrófagos, CMLV y algunos cristales

de colesterol; Grado III, lesiones que contienen macrófagos, CMLV y numerosos cristales de colesterol y Grado IV, placas avanzadas que contiene macrófagos, CMLV y un núcleo necrótico (**Figura 32 D**). Aproximadamente el 40% de las placas en los ratones deficientes para ApoE eran placas avanzadas o de grado IV, mientras que solo un 10% de las mismas podían considerarse tempranas o de Grado I (**Figura 32 D**). Por el contrario, en los ratones doble delecionados encontramos un 40% de placas tempranas, grado I y solo un 4% podían ser consideradas como avanzadas. Estos resultados indican, que TWEAK juegan un papel importante en la progresión de la aterosclerosis acelerada por diabetes.

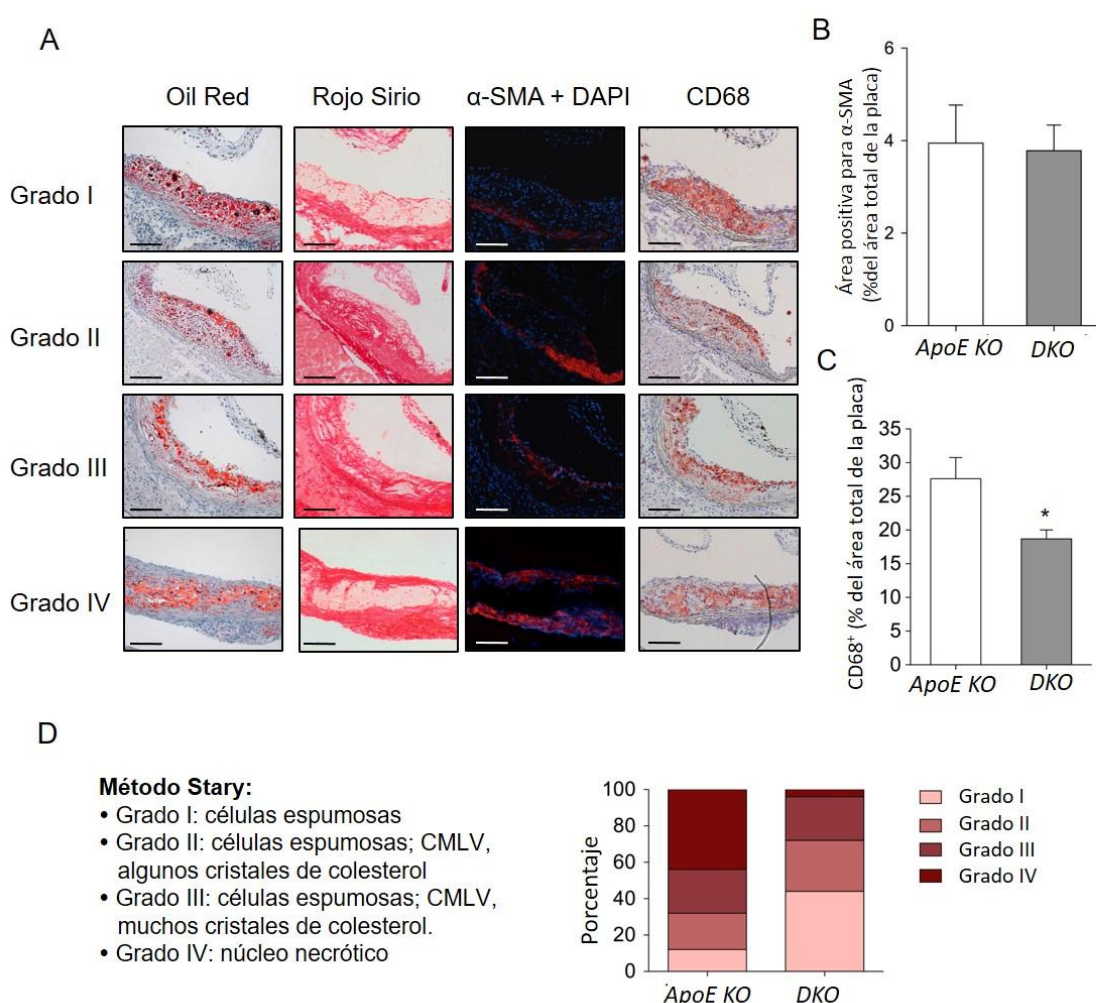


Figura 32. La deficiencia de *Tnfsf12* reduce la progresión de la lesión aterosclerótica en el ratón ApoE diabético.

A, Fotografías representativas del Método Stary, desde el Grado I al IV de secciones teñidas con Oil-Red-O, Rojo Sirio (colágeno) α -SMA + DAPI, CD68; Escala, 200 μ m. B, Cuantificación de α -SMA y C, CD68 en el arco aórtico de los ratones diabéticos de los diferentes grupos. Los valores se muestran como la media \pm EEM de los ratones control (D; N=12) y ratones deficientes para TWEAK (D; N=12). * $p < 0.05$ vs control D, Porcentaje de cada grado del Método Stary entre grupos. N=25 placas por grupo

2.3 La deficiencia de TWEAK reduce la respuesta proinflamatoria inducida por STAT1 en un contexto de hiperglucemia.

La vía JAK/STAT es una vía de señalización intracelular que participa en la respuesta inflamatoria, en condiciones diabéticas (149). Para analizar la implicación de TWEAK en la activación de la vía JAK/STAT cultivamos CMLV en condiciones de baja o alta glucosa y se coincubaron en presencia o ausencia de TWEAK recombinante murino (0,01-0,1 $\mu\text{g/ml}$). TWEAK indujo de forma dosis y tiempo dependiente la fosforilación de STAT-1 pero no de STAT3, tanto en condiciones de alta como baja glucosa (**Figura 33 A-B**).

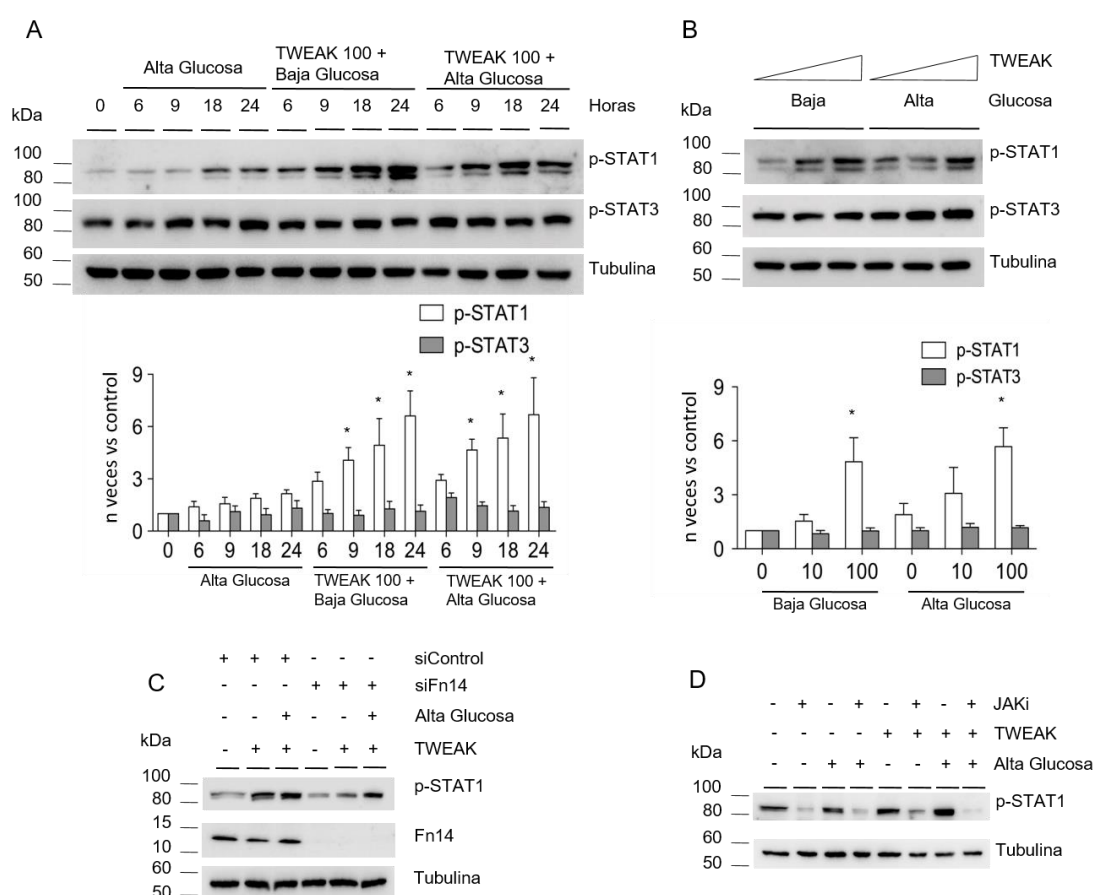


Figura 33. TWEAK activa la vía de STAT1 en CMLV. A, Imagen representativa y análisis de la expresión de pSTAT1 y pSTAT3 a nivel de proteína por Western Blot en CMLV de ratón incubadas en presencia o ausencia de glucosa (25nM) y TWEAKr (100 ng/mL) durante 0 a 24 horas. Los valores se normalizan por tubulina y los resultados se expresan n veces respecto al control. N=4 experimentos independientes. B, Imagen representativa y análisis de la expresión de pSTAT1 y pSTAT3 a nivel de proteína por Western Blot en CMLV de ratón incubadas en presencia o ausencia de glucosa (25nM) y TWEAKr (0, 50 or 100 ng/mL) durante 24 hours. Los valores se normalizan por tubulina y los resultados se expresan n veces respecto al control. N=4 experimentos independientes. C) Análisis por Western-blot de p-STAT1 y Fn14 en CMLV de ratón tras la transfección con un siARN control negativo universal y un siARN para Fn14 (N=4 experimentos independientes). D) Análisis por western-blot de pSTAT1 en CMLV incubadas en presencia o ausencia de alta glucosa (25nM) y rTWEAK (100 ng/mL) durante 24 horas y en presencia o ausencia de un inhibidor de JAK (250 nM) (N=4 experimentos independientes).

Además, confirmamos, mediante experimentos de pérdida de función con un siARN para Fn14, que TWEAK induce la fosforilación de STAT1 en las CMLV, a través de su único receptor funcional conocido, Fn14 (**Figura 33 C**). Así mismo, comprobamos que TWEAK media la fosforilación de STAT-1 a través de la vía de señalización canónica de JAK/STAT en CMLV, ya que al utilizar un inhibidor específico para JAK se evitaba la fosforilación de STAT1 inducida por TWEAK (**Figura 33 D**).

Para conocer si la fosforilación de STAT1 tenía consecuencias funcionales en las CMLV, analizamos la expresión de RNAm de varios genes proinflamatorios regulados por STAT, incluyendo CCL5, CXCL10, y ICAM-1 en CMLV. TWEAK incrementó la expresión de RNAm de CCL5 e ICAM-1 en condiciones de baja glucosa, y de CCL5, CXCL10 e ICAM-1 en condiciones de hiperglucemia (**Figura 34 A**). Es interesante resaltar que el efecto de TWEAK sobre la expresión de CCL5 e ICAM-1 se ve incrementado en condiciones de alta glucosa, lo que indica que existe un efecto aditivo entre TWEAK y glucosa sobre la inducción de la expresión de genes inflamatorios. No se observaron diferencias en la expresión de otro gen proinflamatorio como el TNF- α . Experimentos de pérdida de función, usando un siARN para STAT1 o Fn14, demostraron que TWEAK induce la expresión de CCL5, CXCL10 e ICAM-1, al menos en parte a través de Fn14 y mediante la activación de STAT-1 en las CMLV (**Figura 34 B y C**).

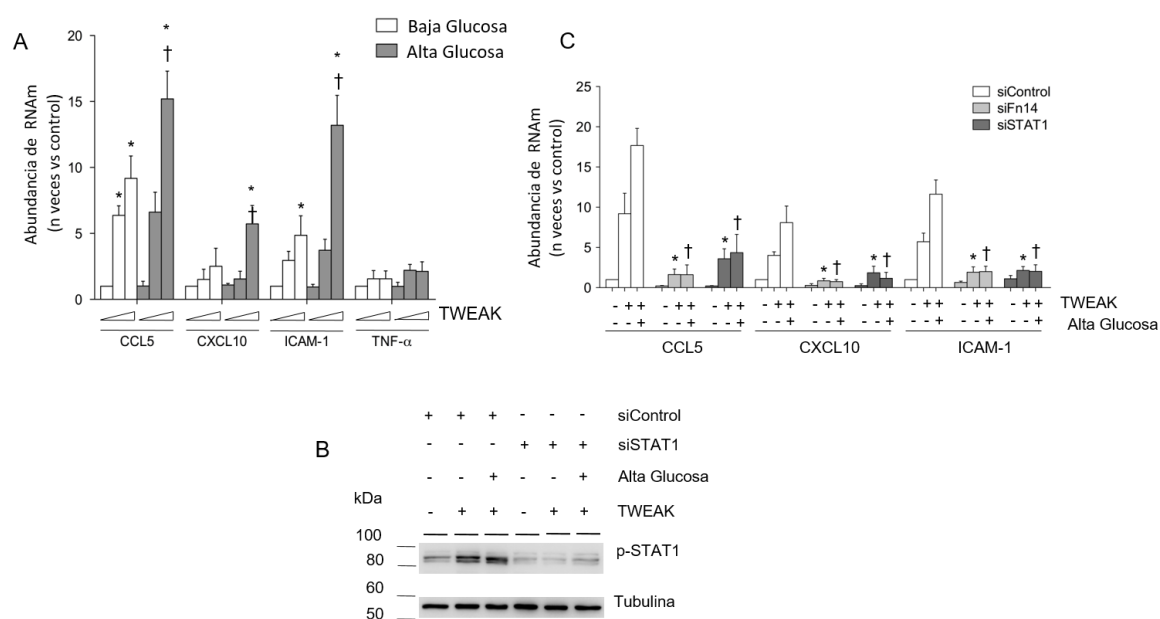


Figura 34. TWEAK induce la expresión de quimioquinas proinflamatorias en las CMLV. A, Análisis por RT-PCR de la expresión de RNAm de CCL5, CXCL10, ICAM-1, TNF- α en CMLV de ratón estimuladas con TWEAK, en presencia de alta o baja glucosa. Los valores se muestran como la media \pm EEM. (N=6 experimentos; * $p < 0.05$ vs control). B, Análisis por western-blot de STAT1 en CMLV y tubulina tras la transfección con un siARN control negativo universal (siARN scramble) y un siARN para STAT1. (N=3 experimentos independientes). C, Análisis por RT-PCR de la expresión de RNAm de CCL5, CXCL10 y ICAM-1 en CMLV de ratón estimuladas con TWEAK en presencia o de alta o baja glucosa tras la transfección con un siARN para Fn14, STAT1, y siARN control. Los valores se muestran como la media \pm EEM. (N=5 experimentos independientes; * $p < 0.05$ vs TWEAK, baja glucosa y siARN control. † $p < 0.05$ vs TWEAK, alta glucosa y siARN control).

Para confirmar los resultados in vitro, analizamos en nuestro modelo animal el contenido de p-STAT1 y p-STAT3 en las placas ateroscleróticas de los arcos aórticos de ratones deficientes para TWEAK y sus controles delecionados para ApoE, observando una reducción significativa del marcaje positivo para p-STAT1 en las placas ateroscleróticas de los ratones dobles deficientes en relación a sus controles (**Figura 35B**). Sin embargo, no observamos diferencias en el contenido de p-STAT3 (**Figura 35 A y B**). Estudios de colocalización mostraron, que p-STAT1 colocaliza tanto con CD68 como con α -SMA dentro de las lesiones ateroscleróticas (**Figura 35 C**). El análisis de otra vía de activación de expresión génica durante la respuesta inflamatoria, como es el factor de transcripción NF- κ B, mostró una reducción de la activación de este factor de transcripción en las placas ateroscleróticas de los ratones deficientes para TWEAK comparados con los ratones control (**Figura 35 A y B**). Este resultado indica que la vía JAK/STAT no es la única en participar en la respuesta inflamatoria inducida por TWEAK bajo condiciones de hiperglucemia.

Finalmente, analizamos la expresión de los genes regulados por STAT1 en las aortas de los animales del modelo. Al igual que observamos en los experimentos in vitro, la expresión de RNAm de CCL5, CXCL10, y ICAM-1 eran menores en los dobles delecionados que en los ratones control (**Figura 35 D**). En el caso de TNF α , no observamos cambios significativos (**Figura 35 D**).

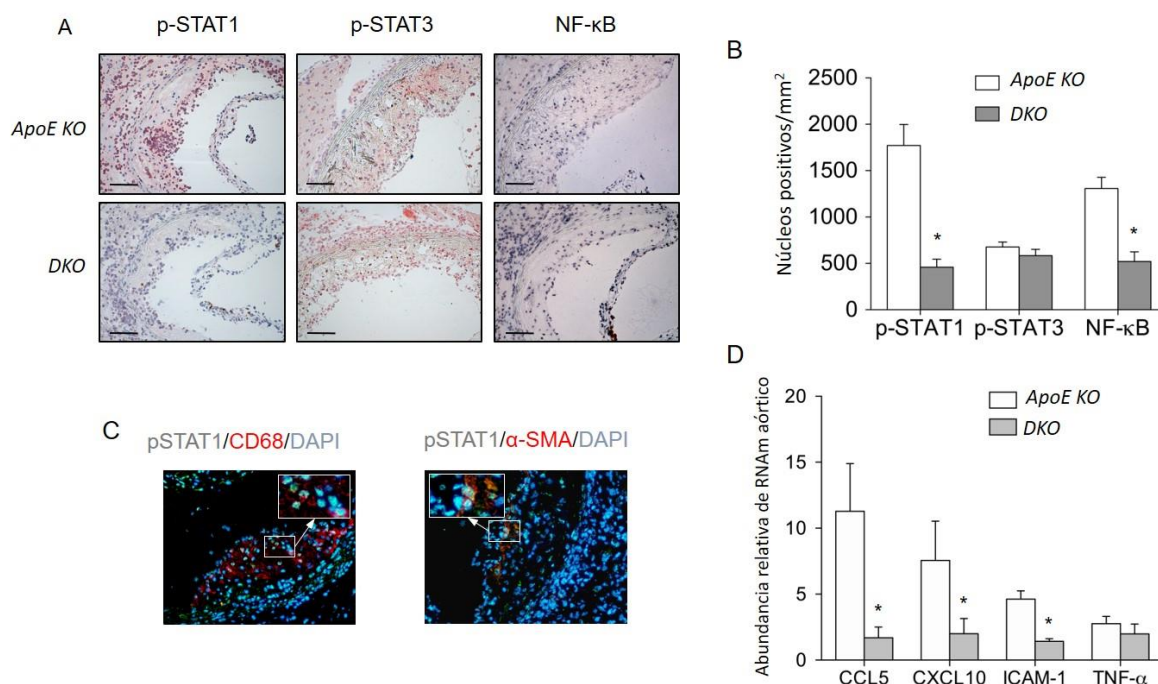


Figura 35 TWEAK activa la vía de STAT1 e induce la expresión de quimioquinas proinflamatorias en ratón. A, Inmunohistoquímica representativa y B, cuantificación de p-STAT1, p-STAT3 y NF-κB activado en las lesiones aórticas de ratones Ratones deficientes para ApoEy *Tnfsf12*^{-/-}ApoE^{-/-}. Los valores se muestran como la media \pm EEM de Ratones deficientes para ApoE(D; N=12) y Ratones deficientes para TWEAK(D; N=12). Escala, 200 μ m. * $p < 0.001$ vs *Tnfsf12*^{+/-}ApoE^{-/-}. C, Microfotografías de fluorescencia de doble tinción de células positivas para CD68⁺ (rojo) o α -SMA⁺ (rojo) y p-STAT1⁺ (verde) en placas ateroscleróticas de los arcos aórticos. Los tejidos se contrastaron con DAPI. D, Análisis por RT-PCR de expresión de RNAm en la aorta completa de CCL5, CXCL10, ICAM-1, TNF- α de ratones Ratones deficientes para ApoEy *Tnfsf12*^{+/-}ApoE^{-/-}. Los valores se muestran como la media \pm EEM de 7 animales incluidos en cada grupo. Escala, 200 μ m. * $p < 0.05$ vs control.

2.4 El tratamiento con un anticuerpo anti-TWEAK reduce la carga aterosclerótica, así como su tamaño y progresión en los ratones deficientes para ApoE diabéticos.

Nuestro siguiente objetivo fue comprobar si los efectos inducidos por TWEAK en este modelo, podrían ser modulados mediante la intervención terapéutica con un anticuerpo bloqueante anti-TWEAK. Para ello, realizamos un modelo animal en el que utilizamos ratones delecionados para ApoE de 16 semanas de edad, a los que indujimos diabetes mediante la

inyección de estroptozotocina. A continuación, los animales se dividieron de forma aleatoria para recibir un anticuerpo anti-TWEAK o una IgG inespecífica (10mg/kg/dos veces por semana) durante 10 semanas. No observamos diferencias significativas en el peso (**Figura 36 A**) ni las concentraciones de glucosa (**Figura 36 B**) entre los dos grupos durante el seguimiento. Tampoco se observaron diferencias significativas entre los grupos en las concentraciones en ayunas de glucosa, colesterol, HDL-c, LDL-C o triglicéridos al finalizar el seguimiento (**Figura 36 C y D**).

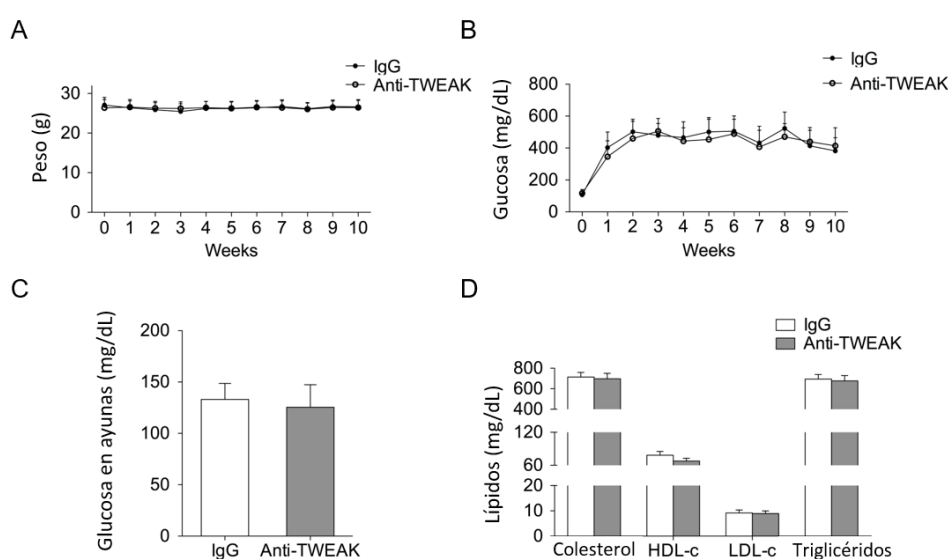


Figura 36. El tratamiento con un anticuerpo anti-TWEAK no altera el peso ni las concentraciones lipídicas y de la glucosa en los sueros de los ratones delecionados para ApoE diabéticos. A, Peso medio y B, niveles de glucosa de ratones tratados con IgG (N=13) y anti-TWEAK (N=13) durante las 10 semanas de estudio. C, Niveles medios de glucosa y D, concentraciones lipídicas de los ratones tratados con IgG (N=13) y anti-TWEAK (N=13) en ayuno.

La tinción de aorta completa con Sudan IV mostró una disminución del 76% de la carga aterosclerótica en los ratones tratados con anti-TWEAK respecto a los tratados con IgG. (**Figura 37 A-B**) ($p < 0,01$). Los ratones tratados con anti-TWEAK, también presentaron un tamaño de la placa menor que los controles en el arco aórtico ($p < 0,005$) (**Figura 37 C-E**). Así mismo, se observó una disminución tanto del tamaño de la lesión como de la oclusión luminal en la arteria braquiocefálica de los ratones tratados con el anticuerpo en comparación con los tratados con la IgG control (54% y 23%; respectivamente; $p < 0,005$ para ambas) (**Figura 37 F-G**).

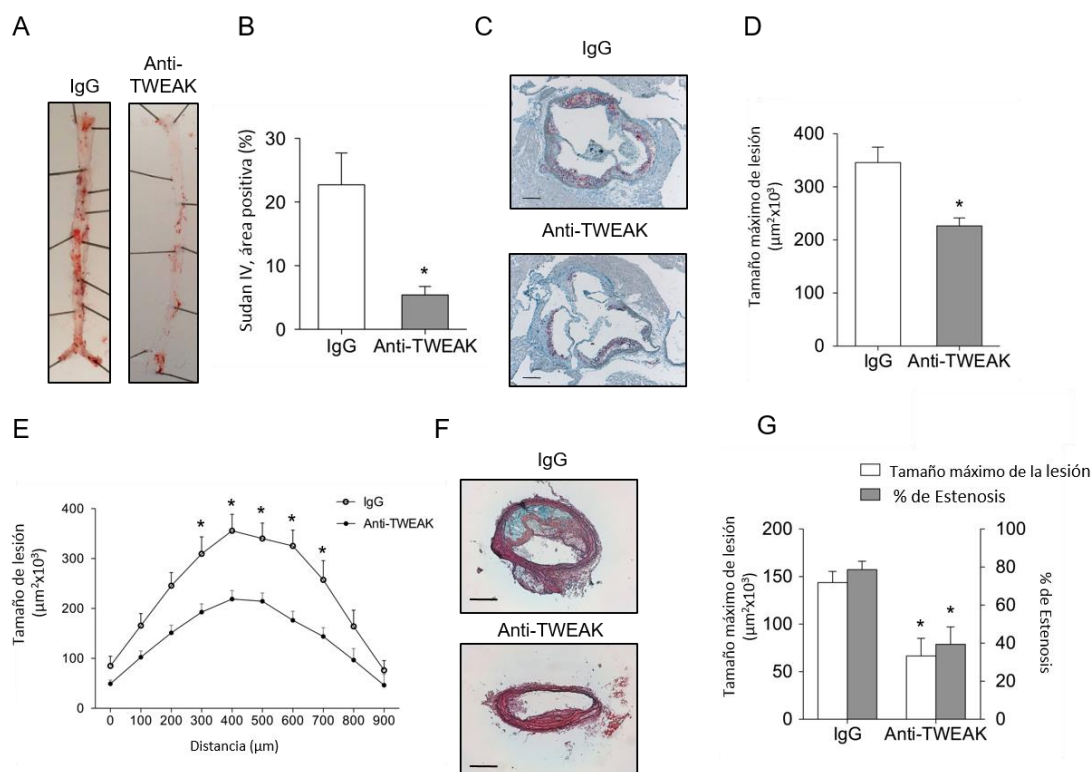


Figura 37 El tratamiento con anti-TWEAK reduce el daño vascular en el ratón ApoE diabético. A, Imágenes representativas de aortas completas teñidas con Sudan IV (Enface) y B, cuantificación de las lesiones correspondientes. Los valores se muestran como la media \pm EEM (N=5 por grupo). * $p < 0.01$ vs IgG. C, Imágenes representativas de Oil-Red-O/Hematoxilina y D, media de la lesión máxima por grupo y cuantificación de la tinción de Oil-Red-O en los arcos aórtico de los ratones del modelo. Los valores se muestran como la media \pm EEM de IgG (N=13) y anti-TWEAK (N=13). * $p < 0.005$ vs IgG. Escala, 200 μ m. E, Cuantificación del área de la lesión a lo largo del arco aórtico en los ratones diabéticos tratados con IgG o Anti-TWEAK. Los valores se muestran como la media \pm EEM de IgG (N=13) y anti-TWEAK (N=13). * $p < 0.01$ vs IgG. F, Fotografías representativas de secciones de arterias braquiocefálicas teñidas con pentacrómico de Movat de los diferentes grupos. G, Media del área máxima de lesión por grupo y porcentaje de oclusión luminal en las arterias braquiocefálicas. Los valores se muestran como la media \pm EEM de IgG (N=13) y anti-TWEAK (N=13). * $p < 0.005$ vs IgG.

Para analizar la composición de las placas, evaluamos el contenido de colágeno, lípidos CMLV y macrófagos tanto en los ratones tratados con anti-TWEAK como en los tratados con IgG. El contenido lípido fue un 35% menor en los ratones tratados con anti-TWEAK comparado con los tratados con IgG (**Figura 36 D, Figura 38 B**) ($p < 0,001$), mientras que el contenido en colágeno era similar en ambos grupos (**Figura 38 A-B**). Tampoco, observamos cambios en el contenido de CMLV entre los grupos (**Figura 38 D**). Sin embargo, sí que observamos un 27% de reducción del contenido de macrófagos en los tratados con el anticuerpo respecto a los controles ($p < 0,005$) (**Figura 38 E**). A partir de estos datos calculamos los coeficientes de estabilidad colágeno/lípido y CMLV/macrófagos confirmando una reducción significativa de

ambos en los animales tratados con anti-TWEAK, comparados con los tratados con la IgG control. Del mismo modo que en los ratones doble delecionados, solo un $\approx 15\%$ de las placas de los ratones tratados con el anticuerpo se podían clasificar como Grado IV o avanzadas, mientras que un 40% de las mismas se podían considerar placas tempranas o Grado I (**Figura 38 F**). Por el contrario, el porcentaje de placas avanzadas en los ratones control, fue de un 40% mientras que solo un 10% de las mismas eran placas tempranas (**Figura 37 F**). Estos datos indican que el tratamiento con el anticuerpo anti-TWEAK, disminuye la progresión de la aterosclerosis acelerada por diabetes.

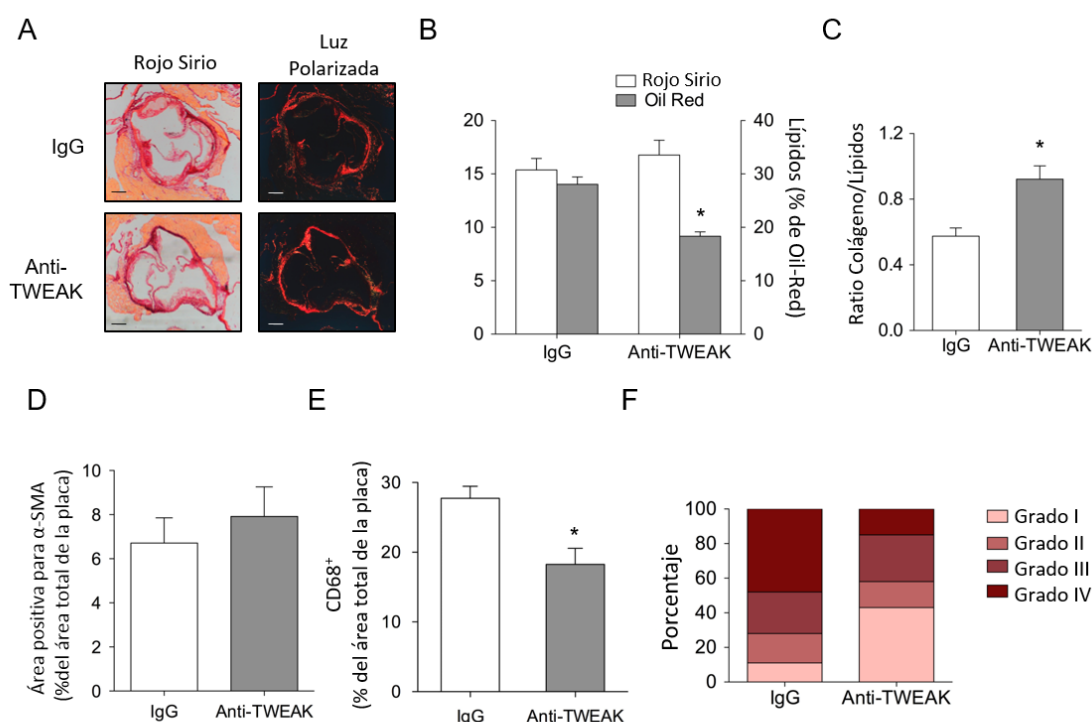


Figura 38 El tratamiento con el anticuerpo anti-TWEAK disminuye la progresión de la placa en el ratón diabético. A, Tinción representativa de Rojo Sirio y Luz Polarizada en el arco aórtico de ratones tratados con anti-TWEAK o IgG. Los valores se muestran como la media \pm EEM de los ratones tratados con IgG (N=13) y anti-TWEAK (N=13). * $p<0.05$ vs IgG. Escala, 200 μ m. B, Cuantificación de Rojo Sirio y Oil-Red-O en el arco aórtico de ratones tratados con anti-TWEAK o IgG. Los valores se muestran como la media \pm EEM de los ratones tratados con IgG (N=13) y anti-TWEAK (N=13). * $p<0.05$ vs IgG. C, La estabilidad de la placa se evaluó mediante el cociente colágeno/lípidos. D, Cuantificación de α -SMA y E, CD68 en los arcos aórticos de ambos grupos. Los valores se muestran como la media \pm EEM de IgG (N=13) y anti-TWEAK (N=13). * $p<0.005$ vs IgG. F, Porcentaje de cada grado del método Stary en ambos grupos. N=29 y N=33 placas procedentes de ratones tratados con IgG y anti-TWEAK, respectivamente.

Finalmente, comprobamos que la fosforilación de STAT1, fue significativamente menor en las placas de los ratones tratados con anti-TWEAK comparado con los tratados con la IgG control (**Figura 39 A-B**). No observamos cambios en el contenido de p-STAT3 en las placas ateroscleróticas de los arcos aórticos de ninguno de los grupos. El tratamiento con el anticuerpo también disminuyó la activación de NF- κ B en las placas ateroscleróticas de los ratones tratados con anti-TWEAK, respecto a sus controles (**Figura 39 A-B**).

La expresión de RNAm de los genes regulados por STAT1, CCL5, CXCL10 e ICAM-1, en las aortas de los ratones tratados con el anticuerpo, también se vió disminuida, respecto a la expresión de RNAm de sus controles (**Figura 39 C**). No se observaron cambios en los niveles de RNAm de TNF- α en ninguno de los grupos analizados.

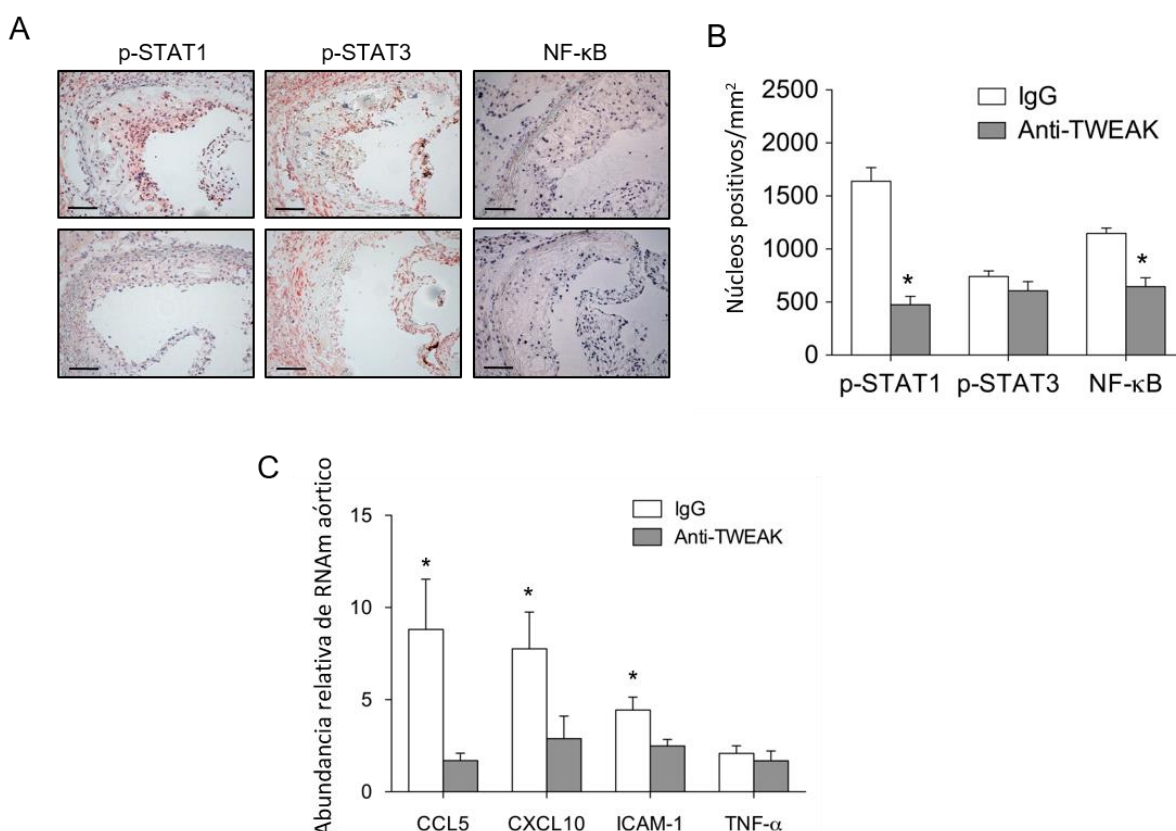


Figura 39. El tratamiento con el anticuerpo anti-TWEAK disminuye la activación de STAT1 en el ratón diabético A, cuantificación de p-STAT1, p-STAT3 y NF- κ B activado en placas ateroscleróticas de los arcos aórticos de los ratones tratados con anti-TWEAK o IgG. Los valores se muestran como la media \pm EEM de IgG (N=13) y anti-TWEAK (N=13) * p <0.001 vs IgG. B, Análisis por RT-PCR de la expresión de RNAm de CCL5, CXCL10, ICAM-1, TNF- α de la aorta completa de los ratones tratados con anti-TWEAK o IgG. Los valores se muestran como la media \pm EEM de 7 animales incluidos en cada grupo. * p <0.05 vs IgG.

V.DISCUSIÓN

Los tejidos sometidos a estrés por daño mecánico, por agentes ambientales o por señales endógenas, poseen una importante habilidad de respuesta, adaptándose para limitar el daño, proteger los tejidos contra el mismo o promover la recuperación normal del tejido. Esto implica la activación y regulación coordinada de diferentes procesos, incluyendo la infiltración de células inflamatorias para retirar las células dañadas y los debrís, la angiogénesis, la reposición de matriz extracelular, así como la proliferación y diferenciación celular para regenerar el tejido. Sin embargo, en algunas circunstancias, la respuesta no es la adecuada, dando lugar a un remodelado tisular no adaptativo o patológico. Un proceso relevante de esta respuesta tisular patológica es la inflamación persistente que ocurre en enfermedades autoinmunes crónicas o enfermedades inflamatorias.

Tanto el remodelado fisiológico como el patológico esta mediado por una compleja red de diferentes tipos celulares y moléculas que continua sin identificarse completamente en la actualidad. Entre estas moleculas se encuentran la citoquina proinflamatoria TWEAK y su receptor Fn14, pertenecientes a la superfamilia del TNF, y que participan tanto en el remodelado tisular fisiológico como en el patológico. TWEAK se expresa fundamentalmente como una citoquina soluble por leucocitos infiltrantes y media múltiples acciones a través de su receptor Fn14, el cual sufre una sobreexpresión local en los tejidos dañados. Sin embargo, en un contexto de daño crónico, cuando la sobreexpresión de Fn14 es persistente provoca una amplificación de la respuesta inflamatoria inducida por TWEAK lo que da lugar a una cronificación del daño, aumentando la fibrosis y dando lugar a un remodelado aberrante (162).

En 2007, nuestro grupo fue el primero en identificar a TWEAK como una proteína que se secretaba diferencialmente en los secretomas procedentes de fragmentos de arterias mamarias sanas y de endarterectomías de arterias carótidas ateroscleróticas. Esto sugería que ésta citoquina podría estar implicada en la patogenia de la aterosclerosis (163). La confirmación posterior de que TWEAK se expresaba en los macrófagos y las CMLV del interior de las placas ateroscleróticas carotídeas humanas (131) no hizo sino corroborar el nexo entre esta citoquina y la enfermedad aterosclerótica.

TWEAK está implicado en diferentes mecanismos asociados a remodelado vascular como son la disfunción endotelial, la respuesta inflamatoria, la proliferación y migración celular, así como la angiogenesis y la trombosis. De hecho, se ha demostrado que la inyección

sistémica de TWEAK acelera el desarrollo de la lesión aterosclerótica en ratones deficientes para ApoE (103). Además, estudios previos han demostrado que la delección génica de TWEAK o el tratamiento con un anticuerpo anti-TWEAK o con una proteína Fn14-Fc reduce el tamaño de la lesión aterosclerótica y aumenta la estabilidad de la placa (103,138,164).

Partiendo de esa base, en este trabajo hemos analizado el papel que juega el eje TWEAK/Fn14 durante otros contextos de remodelado vascular patológico como son el desarrollo del aneurisma de aorta abdominal y la aterosclerosis acelerada por diabetes.

1. La deficiencia de TWEAK o Fn14, reduce el AAA inducido por elastasa en ratones.

El desarrollo, la progresión y la rotura del AAA involucra mecanismos patológicos complejos. La identificación de las causas subyacentes y la obtención de un tratamiento eficaz continúan siendo un gran reto en la medicina vascular actual. El estudio llevado a cabo durante el desarrollo de esta tesis, demuestra que el eje TWEAK/Fn14 es esencial en la formación del AAA en un modelo experimental de perfusión de elastasa en ratón. Estudios previos de nuestro laboratorio, han demostrado que tanto TWEAK como Fn14 se expresan en CMLV, macrófagos y neutrófilos presentes en el de AAA humano (133). Ahora, hemos observado un incremento de la expresión de RNAm de Fn14 en los tejidos aórticos provenientes de pacientes diagnosticados de AAA en relación a la pared sana y confirmamos la presencia de TWEAK tanto en arteria sana como patológica. Para analizar el papel que desempeña el eje TWEAK/Fn14 sobre el desarrollo del AAA, hemos utilizado dos aproximaciones genéticas diferentes, ratones deficientes para TWEAK o para su receptor funcional Fn14. Hemos observado que el eje TWEAK/Fn14 es esencial para la progresión del AAA, ya que promueve la acumulación de células inflamatorias, la neoangiogénesis, la expresión de quimioquinas como CCL2 y CCL5, la pérdida de CMLV y la degradación de la elastina mediada por un aumento de la expresión y actividad de las MMPs. Estudios *in vitro*, confirmaron que TWEAK regula la secreción de quimioquinas proinflamatorias, la viabilidad de las CMLV y la activación de MMP-9.

En publicaciones recientes se han demostrado el papel que desempeña el eje TWEAK/Fn14 en diferentes modelos de remodelado tras daño vascular (162). En nuestro estudio, hemos observado que los ratones deficientes para TWEAK o Fn14 presentan un diámetro aórtico reducido tras la exposición a elastasa. Esta reducción estaba acompañada

por la disminución del contenido inflamatorio. En concreto se observó una reducción de aproximadamente un 60-70% en macrófagos, linfocitos T y neutrófilos en AAA de ratones deficientes para TWEAK o Fn14 comparados con sus controles WT. Estos resultados concuerdan con datos publicados previamente en los que los ratones KO para TWEAK, para su receptor o tratados con anticuerpos bloqueantes contra TWEAK, no eran capaces de reclutar células T, macrófagos o neutrófilos en las regiones de los tejidos dañados en modelos de oclusión de arteria cerebral o aterosclerosis (103,165).

Es probable que los mecanismos implicados en la reducción del contenido inflamatorio observado en los ratones deficientes para TWEAK o Fn14 estén relacionados con la reducción en la expresión de quimioquinas, la disminución de la formación de neovasos y el descenso del número de células proliferativas. TWEAK tiene propiedades proinflamatorias y actúa sobre diferentes tipos celulares relacionados con el remodelado vascular, induciendo la expresión de varias citoquinas y quimioquinas. De hecho, TWEAK induce la secreción CCL2 en células endoteliales humanas (135), en CMLV (103) y macrófagos (166). En nuestro estudio, observamos en experimentos in vitro como la expresión tanto de CCL2 como de CCL5 se ve incrementada por la interacción de TWEAK/Fn14 en CMLV. Además, la secreción de CCL5 también se ve incrementada por la acción de TWEAK en BMDM. El incremento de la expresión de estas quimioquinas tanto en CMLV como en BMDM depende de Fn14, ya que en células procedentes de ratones deficientes para Fn14 no se observó una secreción aumentada de CCL2 ni CCL5 en respuesta a la estimulación con TWEAK. Ambas citoquinas participan en la formación experimental del AAA (167,168) y aparecen sobreexpresadas en AAA humanos (154,155). Estos datos sugirieron que la interacción TWEAK-Fn14 es un mecanismo importante en el reclutamiento de leucocitos durante el desarrollo del AAA.

La neoangiogénesis es una característica típica de la enfermedad aneurismática tanto en condiciones experimentales como en el AAA humanos (153,154). Los vasos del vasa vasorum son las rutas que usan las células inflamatorias para acceder a la íntima y la media aórtica. Los leucocitos inflamatorios como los monocitos/macrófagos producen la citoquina proangiogénica VEGF-A, que participa en la formación de los neovasos mediante la proliferación de células endoteliales. TWEAK es capaz de incrementar la proliferación de las células endoteliales aunque este efecto es independiente de VEGF-A (136). Además, TWEAK, induce angiogénesis en las corneas de ratas (136), y el tratamiento con un anticuerpo anti-

TWEAK disminuye la angiogénesis en un modelo de artritis (169). Durante el desarrollo de esta tesis hemos comprobado que la delección de TWEAK o Fn14 también disminuye de forma sustancial la formación de neovasos en la adventicia aórtica de nuestro modelo animal. Esta disminución podría estar relacionada con una reducción del marcaje de Ki-67 en células endoteliales observado tanto en los ratones deficientes para TWEAK como para Fn14 comparados con los WT en nuestro modelo animal. Sin embargo, no podemos descartar que el marcaje positivo para Ki-67 esté también presente en otros tipos celulares de la lesión aneurismática tales como macrófagos, ya que se ha observado también su proliferación durante la progresión de otras enfermedades de remodelado vascular, como la aterosclerosis (170). Nuestros datos indican que TWEAK participa en la neoangiogénesis durante la progresión del AAA.

La inducción de la apoptosis de las CMLV es un proceso clave en la evolución aneurismática hacia la degeneración de la pared arterial (156). La pérdida de las CMLV observada en los AAA está asociada con la presencia de proteasas activas. La elastasa es una de las proteasas más importantes cuya expresión está presente en las paredes arteriales patológicas. Esta proteína es capaz de degradar la matriz extracelular así como inducir apoptosis en células residentes de la pared vascular (157). En nuestro modelo animal, mediante dos técnicas complementarias como son el TUNEL y el marcaje con un anticuerpo anti-PARP cortada, ambos marcadores de muerte celular programada, hemos observado que los ratones WT tienen un menor número de CMLV comparado con los ratones deficientes para TWEAK o Fn14. Mediante experimentos *in vitro* hemos observado que TWEAK por sí solo no es capaz de disminuir la viabilidad celular de CMLV. Sin embargo, en presencia de concentraciones no letales de elastasa, TWEAK es capaz de inducir muerte celular en las CMLV. Para conseguir este efecto es necesaria la interacción con su receptor Fn14, ya que TWEAK junto con elastasa no tenía ningún efecto sobre la viabilidad de estas células cuando provenían de ratones deficientes para Fn14. Estos resultados indican que TWEAK puede participar en la muerte de las CMLV en presencia de proteasas activas.

Finalmente, la elastasa es el componente estructural mayoritario de la aorta y una de las proteínas más resistentes de la matriz extracelular. La disolución de las fibras elásticas requiere la presencia de proteinasas específicas. En este sentido, algunas MMPs elastolíticas de matriz contribuyen al desarrollo del AAA, incluyendo MMP-2 y MMP-9 y la elastasa

macrofágica MMP-12 (152). En nuestro caso, hemos comprobado que los animales WT presentan una importante degradación de la elastina en sus aortas comparados con los animales deficientes para TWEAK o Fn14. Análisis de FMT *ex vivo* mostraron una reducción de la actividad MMP de un 60% en la región infrarenal aórtica de los ratones deficientes para TWEAK y Fn14. Además, observamos una disminución de la actividad de MMP-9 y MMP-3 en la pared de los aneurismas de los ratones deficientes para TWEAK y Fn14 comparados con sus controles WT. Esta disminución puede relacionarse potencialmente con 2 mecanismos. Primero, con la reducción de la infiltración de leucocitos (la mayor fuente de MMP-9 en el AAA) o, segundo, con una disminución de la expresión de MMPs por las células residentes de la pared vascular (CMLV). Experimentos *in vitro* en CMLV o BMDM demostraron que TWEAK a través de Fn14 incrementaba la expresión y actividad de MMP-9 (166). Estos datos concuerdan con los publicados anteriormente en los que se demostraba que TWEAK incrementaba la actividad de MMP-9 en macrófagos o miotubos, y en miofibros del ratón transgénico de TWEAK (108). Es interesante resaltar que MMP-9 parece ser esencial para el desarrollo del AAA ya que los animales deficientes para MMP-9 son resistentes a la aparición de AAA inducido por elastasa (148). Estos datos indican que TWEAK participa en la degradación de la matriz durante la progresión del AAA mediante la activación de MMP-9. Sin embargo, no podemos descartar la contribución de otras MMPs, como MMP-3. De hecho, la expresión de RNAm de MMP-3 se vio incrementada por TWEAK en BMDM a pesar de que no pudimos observar un incremento de su actividad en estas células después del tratamiento con TWEAK. En este sentido, es importante recordar que los macrófagos son una importante fuente de TWEAK (171). De hecho, las BMDM provenientes de animales WT tienen un incremento de la actividad de MMP-3 comparadas con las provenientes de ratones deficientes para Fn14, lo que sugiere que el TWEAK endógeno puede ser suficiente para aumentar la actividad de MMP-3 y la suplementación con TWEAK recombinante en el medio de cultivo ya no es capaz de incrementar esta actividad.

Por lo tanto, podemos concluir que TWEAK contribuye a la progresión aneurismática promoviendo la acumulación de células inflamatorias en la lesión, así como la angiogénesis, la pérdida de CMLV y la expresión de proteasas. La implicación de TWEAK la respuesta inflamatoria, la viabilidad de las CMLV y el remodelado vascular que hacen del eje TWEAK/Fn14 una potencial diana terapéutica para su tratamiento.

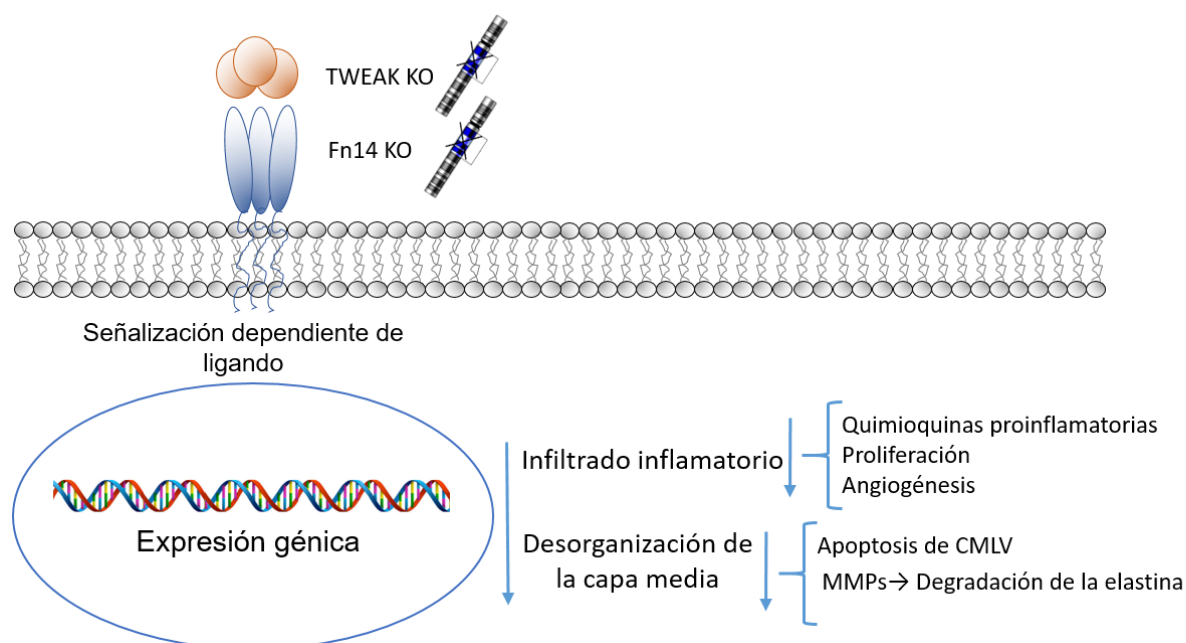


Figura 40. Representación esquemática del efecto de la deficiencia de TWEAK o Fn14 sobre el desarrollo del AAA. La inhibición del eje TWEAK/Fn14 disminuye la incidencia del AAA en un modelo animal por perfusión de elastasa, debido a un menor infiltrado inflamatorio, causado probablemente por la suma de varios factores, como son una menor expresión de quimioquinas proinflamatorias (CCL2 y CCL5), una menor proliferación de leucocitos, así como una angiogénesis disminuida. También hemos comprobado que hay una menor desorganización de la capa media, debido a una menor pérdida de CMLV por apoptosis, así como una menor degradación de las capas elásticas debido a una menor expresión y una actividad disminuida de MMPs. Estos resultados, demuestran que el eje TWEAK/Fn14 participa en el remodelado vascular que tiene lugar durante el desarrollo del AAA.

2. El bloqueo de TWEAK disminuye el tamaño y la progresión de la lesión aterosclerótica debido a la supresión de la vía de señalización de STAT en los ratones diabéticos.

El desarrollo, progresión y rotura de la placa aterosclerótica implica un complejo mecanismo patológico. Como se ha comentado anteriormente, estudios previos han demostrado que TWEAK está implicado en el desarrollo y progresión de las lesiones ateroscleróticas en el ratón hiperlipidémico (103,138,164). Además, Llauradó y col. llevaron a cabo un estudio en el que comprobaron que los niveles circulantes de TWEAK soluble están asociados con la presencia de diabetes tipo 1, encontrando una correlación entre los niveles de ésta proteína, la inflamación sistémica y el riesgo cardiovascular en pacientes con diabetes tipo I (172). La asociación entre los niveles de TWEAK soluble e inflamación también se ha observado en sujetos con diabetes tipo 2 (173). Por lo tanto, estudios previos nos sugerían que la hiperglucemia y otros cambios metabólicos asociados a la presencia de diabetes podían contribuir al desarrollo de vasculopatías a través de la respuesta inflamatoria inducida por TWEAK (133). Nuestros resultados corroboran que el eje TWEAK/Fn14 media las respuestas inflamatorias en condiciones de hiperglucemia. Así, hemos observado como la delección de TWEAK o el tratamiento con un anticuerpo anti-TWEAK disminuyen tanto la carga aterosclerótica como el tamaño de las placas en el arco aórtico y en la arteria braquiocefálica del ratón diabético deficiente para ApoE. Comprobamos que la ausencia o el bloqueo de TWEAK provocó una reducción del contenido de lípidos y macrófagos, así como una reducción de la activación de la proteína STAT1 y de la expresión de citoquinas proinflamatorias y moléculas de adhesión en el tejido aterosclerótico. Estudios *in vitro* en CMLV demostraron que TWEAK induce la fosforilación y activación de STAT1 y la expresión de citoquinas proinflamatorias. Por lo tanto, nuestros datos indican que la inhibición de TWEAK disminuye la respuesta inflamatoria y la progresión de la placa aterosclerótica en el ratón diabético.

Se ha demostrado que TWEAK induce complicaciones metabólicas sistémicas en ratones de avanzada edad a los que se les induce obesidad mediante una dieta con alto contenido en grasa (174). Así mismo, ratones transgénicos para TWEAK (TWEAK-Tg) de avanzada edad (18 meses de edad) tienen obesidad visceral, resistencia a la insulina y disfunción metabólica. Por el contrario, ratones TWEAK-Tg jóvenes (4 meses de edad) no mostraban ninguna diferencia en peso, niveles de glucosa, o tolerancia a la insulina (175). En

nuestro caso, y bajo nuestras condiciones experimentales, no hemos observado diferencias en peso, perfil lipídico o hiperglucemia entre los ratones delecionados para ApoE y los doble delecionados. Los efectos beneficiosos del tratamiento con el anticuerpo anti-TWEAK también fueron independientes de los efectos metabólicos de la diabetes mellitus, ya que no se apreció ningún cambio en los niveles de glucosa, lipídicos o en el peso.

Como se ha comentado con anterioridad, TWEAK y Fn14 se han detectado tanto en CMLV como en macrófagos en placas ateroscleróticas humanas (131,132), relacionándose su expresión con la respuesta inflamatoria (100,103). Estudios recientes han demostrado que el eje TWEAK/Fn14 juega un papel importante en diferentes modelos de remodelado tras daño vascular (162). Aproximaciones de pérdida (por deleción génica o por bloqueo con un anticuerpo anti-TWEAK o una proteína de fusión Fn14-Fc) o ganancia de función (mediante inyección de TWEAK exógeno) han demostrado que el eje TWEAK/Fn14 participa en el desarrollo de placas ateroscleróticas en ratones hiperlipidémicos (103,138). En nuestro caso, hemos observado que el ratón diabético deficiente para ApoE presenta un incremento del 120% en el tamaño de la lesión en el arco aórtico comparado con su homólogo no diabético (ratones ApoE KO, ND). La deficiencia de TWEAK o el tratamiento con el anticuerpo anti-TWEAK atenuó la carga aterosclerótica, el tamaño y la severidad de las lesiones ateroscleróticas en el ratón diabético. De hecho, la mayoría de las lesiones en los ratones control (ApoE KO) o de los ratones tratados con IgG fueron de grado IV según la clasificación por el Método Stary, es decir, lesiones avanzadas, mientras que los ratones doble deficientes o tratados con anticuerpo anti-TWEAK, mostraron en su mayoría, lesiones grado I o tempranas, lo que indica que la deleción de TWEAK o su bloqueo, retrasa la progresión de las placas ateroscleróticas en los ratones hiperlipidémicos en condiciones de hiperglucemia.

Clínicamente, la composición de las lesiones, más que su tamaño o incluso el grado de estenosis, es lo que determina la probabilidad de rotura y las posteriores complicaciones trombóticas (176). A pesar de que los ratones deficientes para ApoE no son particularmente propensos a desarrollar placas inestables en la aorta (177), la deficiencia de TWEAK disminuye las características de vulnerabilidad de las placas de los ratones diabéticos. Las placas inestables son ricas en lípidos y células inflamatorias y muestran una pérdida sustancial de CVML y colágeno. (60). Los lípidos acumulados dentro de la pared arterial son los responsables de incrementar el reclutamiento de monocitos y su posterior diferenciación a macrófagos y

células espumosas. La presencia de LDL-ox dentro de las placas ateroscleróticas incrementa la expresión de moléculas proinflamatorias y MMPs por los macrófagos, contribuyendo de este modo a la inestabilidad de las placas. Además, para contrarrestar el daño vascular, las CMLV experimentan un cambio fenotípico y funcional, pasando de un fenotipo quiescente y contráctil a otro proinflamatorio. Tanto las LDL-ox como la hiperglucemia son capaces de promover este cambio fenotípico en las CMLV asociado a una dediferenciación, proliferación y migración (178,179). Las LDL-ox inducen, además, la expresión de varias citoquinas proinflamatorias, quimioquinas y moléculas de adhesión en las CMLV (180). Así mismo, las LDL-ox provocan un aumento en la actividad de las MMPs en estas células (181) lo que contribuye a la degradación de la matriz, promoviendo la vulnerabilidad de las placas ateroscleróticas. En este sentido, hemos observado que los ratones diabéticos doble delecionados o tratados con anticuerpo anti-TWEAK presentan una reducción del contenido lipídico y macrofágico en las placas ateroscleróticas, sin observar cambios en las CMLV o el contenido de colágeno. Esto da lugar a un aumento de los cocientes colágeno/lípidos y CVML/macrófagos, indicadores de estabilidad de la placa aterosclerótica. La disminución observada en el contenido lipídico puede estar relacionada con una reducción de los macrófagos y células espumosas, como se ha observado en estudios previos en el ratón hiperlipidémico (138). Además, también se ha demostrado que los ratones tratados con Fn14-Fc presentan macrófagos más pequeños en sus placas, efecto que se podría atribuir a una fagocitosis disminuida de lípidos (164). Esto, unido al hecho de que también hay un menor contenido de macrófagos en las placas de los ratones deficientes para TWEAK podría sugerir que la inactivación o el bloqueo de TWEAK es capaz de aumentar las características de estabilidad de la placa aterosclerótica.

El mecanismo subyacente a la reducción de los macrófagos por la deleción o el bloqueo de TWEAK está relacionado con la reducción de la expresión de las citoquinas proinflamatorias. Inicialmente observamos una menor fosforilación de STAT1 en las placas ateroscleróticas tanto en los ratones delecionados para TWEAK como en los tratados con anti-TWEAK al compararlos con sus respectivos controles. Además, hemos observado un incremento de la activación de STAT1 en condiciones de hiperglucemia o en presencia de TWEAK recombinante en CMLV en cultivo. Esta activación era específica de STAT1 dado que otros miembros de esta familia, como STAT3, no se veían afectados por la concentración de

glucosa o TWEAK en nuestras condiciones experimentales. La fosforilación de STAT1 mediada por TWEAK es dependiente de la presencia de su único receptor funcional Fn14, ya que su bloqueo mediante un siARN específico evita la activación de STAT1 inducida por TWEAK en CMLV. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Chapman y cols. que mostraron por primera vez la activación de la vía JAK/STAT inducida por TWEAK activando la fosforilación de STAT1 en células tumorales (101). Además, en nuestros experimentos observamos que la fosforilación de STAT1 inducida por TWEAK se veía bloqueada mediante la adición de un inhibidor de JAK, indicando que TWEAK media la fosforilación de STAT1 a través de la vía de señalización canónica de JAK/STAT en CMLV. La lenta cinética de la activación de STAT1 por TWEAK podría sugerir que la inducción tiene lugar a través de un factor soluble, responsable de la fosforilación de STAT1. De hecho, se ha demostrado que el uso de anticuerpos neutralizantes contra IFN- β , inhibe la fosforilación de STAT1 inducida por TWEAK en células tumorales WiDr. (17). La implicación de la vía de señalización de JAK/STAT en el desarrollo de las placas ateroscleróticas se ha analizado con anterioridad. Se ha demostrado, la expresión de diferentes isoformas de STAT en las áreas de inflamación de las placas ateroscleróticas humanas así como en modelos experimentales de aterosclerosis (118,182,183). El bloqueo total o parcial de algunos miembros de esta vía de señalización, como son STAT1 o STAT3, previenen de la aterosclerosis experimental en ratones (182–184). Además, la ruta de señalización por JAK/STAT es un mecanismo inflamatorio clave por el cual la hiperglucemia contribuye a las complicaciones diabéticas (185,186). De hecho, el bloqueo de la activación de esta vía en ratones diabéticos da lugar a una inhibición de la expresión de genes proinflamatorios, disminuye la infiltración de leucocitos y la activación vascular, dando lugar a la reducción de la progresión de la aterosclerosis (149,186). La respuesta inflamatoria inducida por la vía de señalización JAK/STAT involucra diferentes genes incluyendo quimioquinas, citoquinas, enzimas y proteínas vasoactivas, muchas de las cuales están reguladas al alza en un escenario diabético (19). De entre estos, en esta tesis hemos descrito que TWEAK induce la expresión de RNA mensajero de CCL5 e ICAM-1 en CMLV en cultivo. Las condiciones de hiperglucemia, suponen un efecto aditivo en el aumento de la expresión de RNA mensajero de CCL5, CXCL10 y ICAM-1 inducida por TWEAK en CMLV. También comprobamos, mediante experimentos de pérdida de función usando un siARN para STAT1, que este aumento en la expresión del RNAm de CCL5, CXCL10 e ICAM-1 inducida por TWEAK,

se debía, al menos en parte, a la activación de STAT1. Los hallazgos obtenidos *in vitro* se corroboraron *in vivo*, confirmando la reducción de la expresión de RNAm de CCL5, CXCL10 e ICAM-1 en la aorta de los ratones doble deficientes para o tratados con anticuerpo anti-TWEAK. Aunque la activación de STAT1 parece tener un papel importante en la respuesta inflamatoria inducida por TWEAK en condiciones de hiperglucemia, no podemos excluir otros potenciales mecanismos que podrían participar en la inflamación asociada al desarrollo de la placa aterosclerótica. De hecho, se ha demostrado que la inyección de TWEAK recombinante aumenta la activación de NF- κ B y la expresión de quimioquinas como CCL2 y CCL5 en las placas ateroscleróticas de ratones hiperlipidémicos (11). Además, se ha descrito que esta activación es prolongada, ya que TWEAK provoca una inducción bifásica de las vías canónica y no canónica de NF- κ B, lo que contribuye a la cronificación de la inflamación en patologías como la aterosclerótica. También se ha comprobado que la delección de TWEAK o el tratamiento con anticuerpo anti-TWEAK disminuye la activación de NF- κ B y la expresión de quimioquinas en ratones ApoE en condiciones de normoglucemia. En este trabajo, nosotros hemos observado una disminución de la actividad de NF- κ B en las placas procedentes de ratones doble deficientes o tratados con anti-TWEAK comparados con sus respectivos controles. En este sentido, es muy posible que ambas vías de señalización, JAK/STAT y NF- κ B, participen en la respuesta inflamatoria inducida por TWEAK de forma conjunta en un ambiente hiperglucémico.

Es importante destacar que el anticuerpo anti-TWEAK fue capaz de mimetizar los resultados obtenidos por delección génica, convirtiéndolo en una potencial diana terapéutica para las complicaciones vasculares asociadas a la diabetes, que como hemos dicho es una enfermedad que está creciendo de forma exponencial en todo el mundo.

Este anticuerpo desarrollado por Biogen, está involucrado en varios ensayos clínicos en fase 1 y fase 2 en enfermedades autoinmunes que cursan con inflamación crónica como son la artritis reumatoide o la nefritis lúpica (187–189). Además anticuerpos desarrollados por otras compañías que también inhiben el eje de TWEAK/Fn14 se están estudiando en otras patologías como por ejemplo en cáncer (190–192). Diferentes grupos de investigación están analizando el potencial terapéutico mediado por la inhibición de este eje (84,88,193–201). Entre ellos, el estudio publicado por Jarr y colaboradores, sigue nuestra misma línea de evidencia, ya que en su caso el anticuerpo anti-TWEAK es capaz de proteger contra el

remodelado adverso tras infarto de miocardio en un modelo experimental de ratón (197). Además, los resultados previos de nuestro grupo también demuestran el efecto beneficioso del uso de este anticuerpo neutralizante, reduciendo las lesiones ateroscleróticas, promoviendo la estabilidad de las mismas y disminuyendo las complicaciones protromboticas asociadas (103,138,143).

En conclusión, este es el primer estudio en analizar la importancia del eje TWEK/Fn14 en un modelo experimental de aterosclerosis acelerada por diabetes. Nuestros datos evidencian que la inhibición de TWEAK mejora la aterosclerosis asociada diabetes, a través de la atenuación de la activación de STAT1 y la consecuente disminución de la expresión de citoquinas proinflamatorias, lo que conlleva una reducción en el infiltrado inflamatorio, una disminución del desarrollo de la lesión aterosclerótica y un incremento de la estabilidad de la misma. El bloqueo de TWEAK podría ser una nueva aproximación terapéutica para limitar las complicaciones vasculares asociadas a la diabetes.

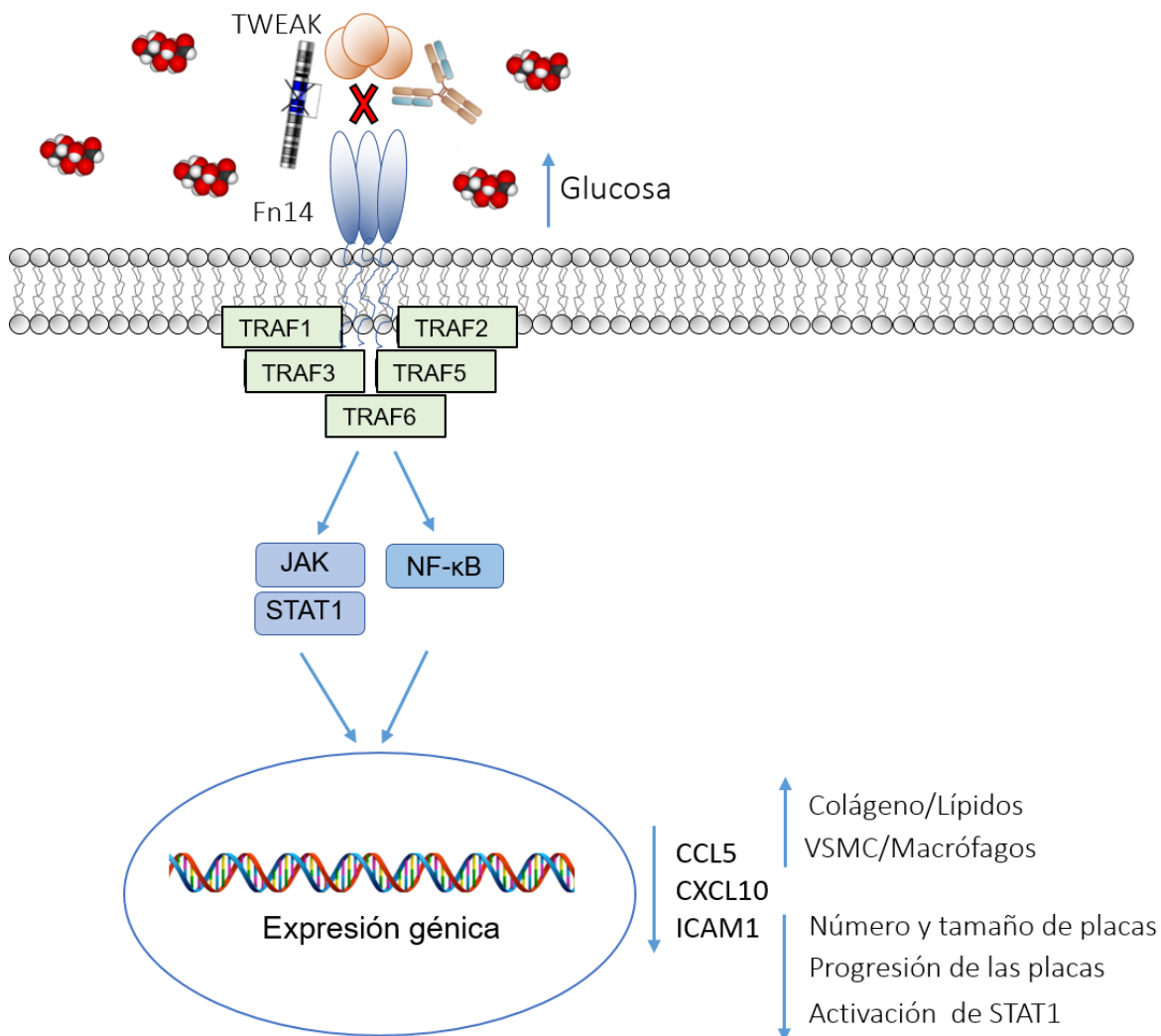


Figura 41. Representación esquemática del efecto del bloqueo del eje TWEAK/Fn14 sobre el desarrollo de las placas ateroscleróticas en condiciones de hiperglucemia. La inhibición del eje TWEAK/Fn14 por delección génica o por bloqueo terapéutico con un anticuerpo anti-TWEAK disminuye el número y el tamaño de las placas ateroscleróticas en un modelo de ratones diabéticos. Hemos comprobado que, bloqueando este eje en nuestras condiciones de estudio, se inhibe la fosforilación de STAT1 lo que evita la expresión de varios genes como son CCL5, CXCL10 o ICAM. Esto retrasa la progresión de las placas ateroscleróticas, promoviendo además la estabilidad de las mismas. Estos resultados, demuestran que el eje TWEAK/Fn14 participa en progresión acelerada de la aterosclerosis que tiene lugar en los pacientes diabéticos y que el bloqueo terapéutico con un anticuerpo anti-TWEAK podría ser una buena diana terapéutica en el tratamiento de enfermedades en las que interviene el remodelado vascular patológico.

VI.CONCLUSIONES

Durante el desarrollo de esta tesis hemos analizado el papel de la citoquina proinflamatoria TWEAK en relación con las enfermedades que implican remodelado vascular patológico, en concreto durante la formación del AAA y la progresión de la aterosclerosis en condiciones de hiperglucemia. Las conclusiones finales de nuestra investigación son las siguientes:

- 1-. La deficiencia de TWEAK o Fn14 reduce la incidencia de AAA debido a una disminución de la dilatación aortica producida por la perfusión de elastasa en un modelo experimental de ratón.
- 2-. La delección génica de TWEAK o Fn14 disminuye la progresión del AAA debido a una reducción en el infiltrado inflamatorio, en la angiogénesis y en la proliferación celular.
- 3-. La desorganización de la capa media se previene aumentando la viabilidad de CMLV en ratones deficientes para TWEAK o Fn14.
- 4-. La deficiencia de TWEAK o Fn14 disminuye la fragmentación de la elastina de la capa media a través de la inhibición de la expresión y activación de MMPs, como la MMP-3 y 9.
- 5-. La aceleración en la formación de las placas ateroscleróticas en el ratón deficiente para ApoE inducida por la hiperglucemia se previene mediante la delección génica de TWEAK. Además, ratones diabéticos doble deficientes para TWEAK y ApoE presentan una carga aterosclerótica y un tamaño de lesión similar a los observados en ratones deficientes para ApoE normoglucémicos.
- 6-. La delección génica de TWEAK evita la progresión de la aterosclerosis en los ratones ApoE diabéticos, debido a una variación en la composición de las placas ateroscleróticas que presentaron una importante disminución del contenido de lípidos y macrófagos.
- 7-. La disminución de la respuesta inflamatoria observada en ratones deficientes para TWEAK se relaciona con la reducción de la activación de STAT1 en condiciones de hiperglucemia, así como de la expresión de genes proinflamatorios bajo su control transcripcional.

8-. El tratamiento terapéutico con anti-TWEAK es capaz de mimetizar el fenotipo obtenido en los ratones diabéticos doble deficientes para TWEAK y ApoE.

Por lo tanto, esta tesis doctoral revela que TWEAK participa en el remodelado vascular que tiene lugar durante la formación y progresión del AAA y de la aterosclerosis inducida por hiperglucemia. Todos estos resultados ponen de manifiesto que el sistema TWEAK-Fn14 podría ser una nueva diana terapéutica para el tratamiento del remodelado vascular patológico.

VII.BIBLIOGRAFIA

Bibliografía

1. Glagov S, Weisenberg E, Zarins CK, Stankunavicius R, Kolettis GJ. Compensatory enlargement of human atherosclerotic coronary arteries. *N Engl J Med*. 28 de mayo de 1987;316(22):1371-5.
2. Gibbons GH, Dzau VJ. The emerging concept of vascular remodeling. *N Engl J Med*. 19 de mayo de 1994;330(20):1431-8.
3. Renna NF, de Las Heras N, Miatello RM. Pathophysiology of vascular remodeling in hypertension. *Int J Hypertens*. 2013;2013:808353.
4. Lopez AD, Mathers CD, Ezzati M, Jamison DT, Murray CJL. Global and regional burden of disease and risk factors, 2001: systematic analysis of population health data. *Lancet Lond Engl*. 27 de mayo de 2006;367(9524):1747-57.
5. Filardo G, Powell JT, Martinez MA-M, Ballard DJ. Surgery for small asymptomatic abdominal aortic aneurysms. *Cochrane Database Syst Rev*. 2015;(2):CD001835.
6. Moll FL, Powell JT, Fraedrich G, Verzini F, Haulon S, Waltham M, et al. Management of abdominal aortic aneurysms clinical practice guidelines of the European society for vascular surgery. *Eur J Vasc Endovasc Surg Off J Eur Soc Vasc Surg*. enero de 2011;41 Suppl 1:S1-58.
7. Suliman AS, Raffetto JD, Seidman CS, Menzoian JO. Acute thrombosis of abdominal aortic aneurysms--report of two cases and review of the literature. *Vasc Endovascular Surg*. febrero de 2003;37(1):71-5.
8. Lindeman JHN. The pathophysiologic basis of abdominal aortic aneurysm progression: a critical appraisal. *Expert Rev Cardiovasc Ther*. 2015;13(7):839-51.
9. Larsson E, Granath F, Swedenborg J, Hultgren R. More patients are treated for nonruptured abdominal aortic aneurysms, but the proportion of women remains unchanged. *J Vasc Surg*. octubre de 2008;48(4):802-7.
10. Olsson C, Thelin S, Ståhle E, Ekblom A, Granath F. Thoracic aortic aneurysm and dissection: increasing prevalence and improved outcomes reported in a nationwide population-based study of more than 14,000 cases from 1987 to 2002. *Circulation*. 12 de diciembre de 2006;114(24):2611-8.
11. Jongkind V, Yeung KK, Akkersdijk GJM, Heidsieck D, Reitsma JB, Tangelder GJ, et al. Juxtarenal aortic aneurysm repair. *J Vasc Surg*. septiembre de 2010;52(3):760-7.
12. Tromp G, Kuivaniemi H, Hinterseher I, Carey DJ. Novel genetic mechanisms for aortic aneurysms. *Curr Atheroscler Rep*. julio de 2010;12(4):259-66.
13. Greco G, Egorova NN, Gelijns AC, Moskowitz AJ, Manganaro AJ, Zwolak RM, et al. Development of a novel scoring tool for the identification of large ≥ 5 cm abdominal aortic aneurysms. *Ann Surg*. octubre de 2010;252(4):675-82.
14. Kent KC, Zwolak RM, Egorova NN, Riles TS, Manganaro A, Moskowitz AJ, et al. Analysis of risk factors for abdominal aortic aneurysm in a cohort of more than 3 million individuals. *J Vasc Surg*. septiembre de 2010;52(3):539-48.
15. Smelser DT, Tromp G, Elmore JR, Kuivaniemi H, Franklin DP, Kirchner HL, et al. Population risk factor estimates for abdominal aortic aneurysm from electronic medical records: a case control study. *BMC Cardiovasc Disord*. 2014;14:174.

16. Wahlgren CM, Larsson E, Magnusson PKE, Hultgren R, Swedenborg J. Genetic and environmental contributions to abdominal aortic aneurysm development in a twin population. *J Vasc Surg.* enero de 2010;51(1):3-7; discussion 7.
17. Boddy AM, Lenk GM, Lillvis JH, Nischan J, Kyo Y, Kuivaniemi H. Basic research studies to understand aneurysm disease. *Drug News Perspect.* abril de 2008;21(3):142-8.
18. Kuivaniemi H, Platsoucas CD, Tilson MD. Aortic aneurysms: an immune disease with a strong genetic component. *Circulation.* 15 de enero de 2008;117(2):242-52.
19. Dale MA, Ruhlman MK, Baxter BT. Inflammatory cell phenotypes in AAAs: their role and potential as targets for therapy. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* agosto de 2015;35(8):1746-55.
20. Shah PK. Inflammation, metalloproteinases, and increased proteolysis: an emerging pathophysiological paradigm in aortic aneurysm. *Circulation.* 7 de octubre de 1997;96(7):2115-7.
21. Sakalihasan N, Limet R, Defawe OD. Abdominal aortic aneurysm. *Lancet Lond Engl.* 30 de mayo de 2005;365(9470):1577-89.
22. Thompson RW, Liao S, Curci JA. Vascular smooth muscle cell apoptosis in abdominal aortic aneurysms. *Coron Artery Dis.* octubre de 1997;8(10):623-31.
23. Michel J-B, Martin-Ventura J-L, Egido J, Sakalihasan N, Treska V, Lindholt J, et al. Novel aspects of the pathogenesis of aneurysms of the abdominal aorta in humans. *Cardiovasc Res.* 1 de abril de 2011;90(1):18-27.
24. Baxter BT, Terrin MC, Dalman RL. Medical Management of Small Abdominal Aortic Aneurysms. *Circulation.* 8 de abril de 2008;117(14):1883-9.
25. Choke E, Cockerill G, Wilson WRW, Sayed S, Dawson J, Loftus I, et al. A review of biological factors implicated in abdominal aortic aneurysm rupture. *Eur J Vasc Endovasc Surg Off J Eur Soc Vasc Surg.* septiembre de 2005;30(3):227-44.
26. Lederle FA, Wilson SE, Johnson GR, Reinke DB, Littooy FN, Acher CW, et al. Immediate repair compared with surveillance of small abdominal aortic aneurysms. *N Engl J Med.* 9 de mayo de 2002;346(19):1437-44.
27. Mortality results for randomised controlled trial of early elective surgery or ultrasonographic surveillance for small abdominal aortic aneurysms. The UK Small Aneurysm Trial Participants. *Lancet Lond Engl.* 21 de noviembre de 1998;352(9141):1649-55.
28. Biros E, Gäbel G, Moran CS, Schreurs C, Lindeman JHN, Walker PJ, et al. Differential gene expression in human abdominal aortic aneurysm and aortic occlusive disease. *Oncotarget.* 30 de mayo de 2015;6(15):12984-96.
29. Wang Y, Krishna S, Golledge J. The calcium chloride-induced rodent model of abdominal aortic aneurysm. *Atherosclerosis.* enero de 2013;226(1):29-39.
30. Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature.* 19 de diciembre de 2002;420(6917):868-74.
31. Viles-Gonzalez JF, Fuster V, Badimon JJ. Atherothrombosis: a widespread disease with unpredictable and life-threatening consequences. *Eur Heart J.* julio de 2004;25(14):1197-207.

32. Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med*. 21 de abril de 2005;352(16):1685-95.
33. Andrews TC, Raby K, Barry J, Naimi CL, Allred E, Ganz P, et al. Effect of cholesterol reduction on myocardial ischemia in patients with coronary disease. *Circulation*. 21 de enero de 1997;95(2):324-8.
34. Newby DE, Wright RA, Labinjoh C, Ludlam CA, Fox KA, Boon NA, et al. Endothelial dysfunction, impaired endogenous fibrinolysis, and cigarette smoking: a mechanism for arterial thrombosis and myocardial infarction. *Circulation*. 23 de marzo de 1999;99(11):1411-5.
35. Lewis TV, Dart AM, Chin-Dusting JP. Endothelium-dependent relaxation by acetylcholine is impaired in hypertriglyceridemic humans with normal levels of plasma LDL cholesterol. *J Am Coll Cardiol*. marzo de 1999;33(3):805-12.
36. Panza JA, García CE, Kilcoyne CM, Quyyumi AA, Cannon RO. Impaired endothelium-dependent vasodilation in patients with essential hypertension. Evidence that nitric oxide abnormality is not localized to a single signal transduction pathway. *Circulation*. 15 de marzo de 1995;91(6):1732-8.
37. Kawano H, Motoyama T, Hirashima O, Hirai N, Miyao Y, Sakamoto T, et al. Hyperglycemia rapidly suppresses flow-mediated endothelium-dependent vasodilation of brachial artery. *J Am Coll Cardiol*. julio de 1999;34(1):146-54.
38. İlhan F, Kalkanlı ST. Atherosclerosis and the role of immune cells. *World J Clin Cases*. 16 de abril de 2015;3(4):345-52.
39. Manduteanu I, Simionescu M. Inflammation in atherosclerosis: a cause or a result of vascular disorders? *J Cell Mol Med*. septiembre de 2012;16(9):1978-90.
40. Smith JD, Trogan E, Ginsberg M, Grigaux C, Tian J, Miyata M. Decreased atherosclerosis in mice deficient in both macrophage colony-stimulating factor (op) and apolipoprotein E. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 29 de agosto de 1995;92(18):8264-8.
41. Lafont A. Basic aspects of plaque vulnerability. *Heart Br Card Soc*. octubre de 2003;89(10):1262-7.
42. Sessa R, Pietro MD, Filardo S, Turriziani O. Infectious burden and atherosclerosis: A clinical issue. *World J Clin Cases WJCC*. 16 de julio de 2014;2(7):240-9.
43. Hulsmans M, Holvoet P. The vicious circle between oxidative stress and inflammation in atherosclerosis. *J Cell Mol Med*. enero de 2010;14(1-2):70-8.
44. Moore KJ, Tabas I. Macrophages in the pathogenesis of atherosclerosis. *Cell*. 29 de abril de 2011;145(3):341-55.
45. Newby AC, George SJ, Ismail Y, Johnson JL, Sala-Newby GB, Thomas AC. Vulnerable atherosclerotic plaque metalloproteinases and foam cell phenotypes. *Thromb Haemost*. junio de 2009;101(6):1006-11.
46. Hellings WE, Peeters W, Moll FL, Piers SRD, van Setten J, Van der Spek PJ, et al. Composition of carotid atherosclerotic plaque is associated with cardiovascular outcome: a prognostic study. *Circulation*. 4 de mayo de 2010;121(17):1941-50.

47. Fuster V, Moreno PR, Fayad ZA, Corti R, Badimon JJ. Atherothrombosis and high-risk plaque: part I: evolving concepts. *J Am Coll Cardiol*. 20 de septiembre de 2005;46(6):937-54.
48. Ishibashi S, Brown MS, Goldstein JL, Gerard RD, Hammer RE, Herz J. Hypercholesterolemia in low density lipoprotein receptor knockout mice and its reversal by adenovirus-mediated gene delivery. *J Clin Invest*. agosto de 1993;92(2):883-93.
49. Bentzon JF, Falk E. Atherosclerotic lesions in mouse and man: is it the same disease? *Curr Opin Lipidol*. octubre de 2010;21(5):434-40.
50. Knowles JW, Maeda N. Genetic modifiers of atherosclerosis in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. noviembre de 2000;20(11):2336-45.
51. Véniant MM, Zlot CH, Walzem RL, Pierotti V, Driscoll R, Dichek D, et al. Lipoprotein clearance mechanisms in LDL receptor-deficient «Apo-B48-only» and «Apo-B100-only» mice. *J Clin Invest*. 15 de octubre de 1998;102(8):1559-68.
52. Hastay AH, Shimano H, Osuga J, Namatame I, Takahashi A, Yahagi N, et al. Severe hypercholesterolemia, hypertriglyceridemia, and atherosclerosis in mice lacking both leptin and the low density lipoprotein receptor. *J Biol Chem*. 5 de octubre de 2001;276(40):37402-8.
53. Sanan DA, Newland DL, Tao R, Marcovina S, Wang J, Mooser V, et al. Low density lipoprotein receptor-negative mice expressing human apolipoprotein B-100 develop complex atherosclerotic lesions on a chow diet: no accentuation by apolipoprotein(a). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 14 de abril de 1998;95(8):4544-9.
54. Zhang SH, Reddick RL, Piedrahita JA, Maeda N. Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lesions in mice lacking apolipoprotein E. *Science*. 16 de octubre de 1992;258(5081):468-71.
55. Plump AS, Smith JD, Hayek T, Aalto-Setälä K, Walsh A, Verstuyft JG, et al. Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice created by homologous recombination in ES cells. *Cell*. 16 de octubre de 1992;71(2):343-53.
56. Nakashima Y, Plump AS, Raines EW, Breslow JL, Ross R. ApoE-deficient mice develop lesions of all phases of atherosclerosis throughout the arterial tree. *Arterioscler Thromb J Vasc Biol Am Heart Assoc*. enero de 1994;14(1):133-40.
57. Zaragoza C, Gomez-Guerrero C, Martin-Ventura JL, Blanco-Colio L, Lavin B, Mallavia B, et al. Animal models of cardiovascular diseases. *J Biomed Biotechnol*. 2011;2011:497841.
58. Hofker MH, van Vlijmen BJ, Havekes LM. Transgenic mouse models to study the role of APOE in hyperlipidemia and atherosclerosis. *Atherosclerosis*. marzo de 1998;137(1):1-11.
59. Reaven P, Merat S, Casanada F, Sutphin M, Palinski W. Effect of streptozotocin-induced hyperglycemia on lipid profiles, formation of advanced glycation endproducts in lesions, and extent of atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. octubre de 1997;17(10):2250-6.
60. Shen X, Bornfeldt KE. Mouse models for studies of cardiovascular complications of type 1 diabetes. *Ann N Y Acad Sci*. abril de 2007;1103:202-17.
61. Rafieian-Kopaei M, Setorki M, Doudi M, Baradaran A, Nasri H. Atherosclerosis: process, indicators, risk factors and new hopes. *Int J Prev Med*. agosto de 2014;5(8):927-46.

62. Albertini R, Moratti R, De Luca G. Oxidation of low-density lipoprotein in atherosclerosis from basic biochemistry to clinical studies. *Curr Mol Med*. septiembre de 2002;2(6):579-92.
63. American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*. enero de 2014;37 Suppl 1:S81-90.
64. Leon BM, Maddox TM. Diabetes and cardiovascular disease: Epidemiology, biological mechanisms, treatment recommendations and future research. *World J Diabetes*. 10 de octubre de 2015;6(13):1246-58.
65. Scully T. Diabetes in numbers. *Nature*. 17 de mayo de 2012;485(7398):S2-3.
66. Forbes JM, Cooper ME. Mechanisms of diabetic complications. *Physiol Rev*. enero de 2013;93(1):137-88.
67. Bierman EL. George Lyman Duff Memorial Lecture. Atherogenesis in diabetes. *Arterioscler Thromb J Vasc Biol Am Heart Assoc*. junio de 1992;12(6):647-56.
68. Pyörälä K, Laakso M, Uusitupa M. Diabetes and atherosclerosis: an epidemiologic view. *Diabetes Metab Rev*. abril de 1987;3(2):463-524.
69. Nishigaki I, Hagihara M, Tsunekawa H, Maseki M, Yagi K. Lipid peroxide levels of serum lipoprotein fractions of diabetic patients. *Biochem Med*. junio de 1981;25(3):373-8.
70. Stocker R, Keaney JF. Role of oxidative modifications in atherosclerosis. *Physiol Rev*. octubre de 2004;84(4):1381-478.
71. Brownlee M. The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. *Diabetes*. junio de 2005;54(6):1615-25.
72. Hartge MM, Unger T, Kintscher U. The endothelium and vascular inflammation in diabetes. *Diab Vasc Dis Res*. junio de 2007;4(2):84-8.
73. Altabas V. Diabetes, Endothelial Dysfunction, and Vascular Repair: What Should a Diabetologist Keep His Eye on? *Int J Endocrinol*. 2015;2015:848272.
74. Paneni F, Beckman JA, Creager MA, Cosentino F. Diabetes and vascular disease: pathophysiology, clinical consequences, and medical therapy: part I. *Eur Heart J*. agosto de 2013;34(31):2436-43.
75. Harja E, Bu D, Hudson BI, Chang JS, Shen X, Hallam K, et al. Vascular and inflammatory stresses mediate atherosclerosis via RAGE and its ligands in apoE^{-/-} mice. *J Clin Invest*. enero de 2008;118(1):183-94.
76. Srivastava AK. High glucose-induced activation of protein kinase signaling pathways in vascular smooth muscle cells: a potential role in the pathogenesis of vascular dysfunction in diabetes (review). *Int J Mol Med*. enero de 2002;9(1):85-9.
77. Foster D, Parrish-Novak J, Fox B, Xu W. Cytokine-receptor pairing: accelerating discovery of cytokine function. *Nat Rev Drug Discov*. febrero de 2004;3(2):160-70.
78. Bodmer J-L, Schneider P, Tschoopp J. The molecular architecture of the TNF superfamily. *Trends Biochem Sci*. enero de 2002;27(1):19-26.

79. Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell*. 23 de febrero de 2001;104(4):487-501.
80. Chicheportiche Y, Bourdon PR, Xu H, Hsu YM, Scott H, Hession C, et al. TWEAK, a new secreted ligand in the tumor necrosis factor family that weakly induces apoptosis. *J Biol Chem*. 19 de diciembre de 1997;272(51):32401-10.
81. Campbell S, Burkly LC, Gao H-X, Berman JW, Su L, Browning B, et al. Proinflammatory effects of TWEAK/Fn14 interactions in glomerular mesangial cells. *J Immunol Baltim Md 1950*. 1 de febrero de 2006;176(3):1889-98.
82. Wiley SR, Winkles JA. TWEAK, a member of the TNF superfamily, is a multifunctional cytokine that binds the TweakR/Fn14 receptor. *Cytokine Growth Factor Rev*. agosto de 2003;14(3-4):241-9.
83. Phillips TA, Ni J, Hunt JS. Death-inducing tumour necrosis factor (TNF) superfamily ligands and receptors are transcribed in human placenta, cytotrophoblasts, placental macrophages and placental cell lines. *Placenta*. octubre de 2001;22(8-9):663-72.
84. Kawakita T, Shiraki K, Yamanaka Y, Yamaguchi Y, Saitou Y, Enokimura N, et al. Functional expression of TWEAK in human hepatocellular carcinoma: possible implication in cell proliferation and tumor angiogenesis. *Biochem Biophys Res Commun*. 4 de junio de 2004;318(3):726-33.
85. Chicheportiche Y, Fossati-Jimack L, Moll S, Ibnou-Zekri N, Izui S. Down-regulated expression of TWEAK mRNA in acute and chronic inflammatory pathologies. *Biochem Biophys Res Commun*. 9 de diciembre de 2000;279(1):162-5.
86. Semov A, Semova N, Lacelle C, Marcotte R, Petroulakis E, Proestou G, et al. Alterations in TNF- and IL-related gene expression in space-flown WI38 human fibroblasts. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol*. junio de 2002;16(8):899-901.
87. Felli N, Pedini F, Zeuner A, Petrucci E, Testa U, Conticello C, et al. Multiple members of the TNF superfamily contribute to IFN-gamma-mediated inhibition of erythropoiesis. *J Immunol Baltim Md 1950*. 1 de agosto de 2005;175(3):1464-72.
88. Desplat-Jégo S, Creidy R, Varriale S, Allaire N, Luo Y, Bernard D, et al. Anti-TWEAK monoclonal antibodies reduce immune cell infiltration in the central nervous system and severity of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Clin Immunol Orlando Fla*. octubre de 2005;117(1):15-23.
89. Winkles JA. The TWEAK-Fn14 cytokine-receptor axis: discovery, biology and therapeutic targeting. *Nat Rev Drug Discov*. mayo de 2008;7(5):411-25.
90. Wiley SR, Cassiano L, Lofton T, Davis-Smith T, Winkles JA, Lindner V, et al. A novel TNF receptor family member binds TWEAK and is implicated in angiogenesis. *Immunity*. noviembre de 2001;15(5):837-46.
91. Meighan-Mantha RL, Hsu DK, Guo Y, Brown SA, Feng SL, Peifley KA, et al. The mitogen-inducible Fn14 gene encodes a type I transmembrane protein that modulates fibroblast adhesion and migration. *J Biol Chem*. 12 de noviembre de 1999;274(46):33166-76.

92. Feng SL, Guo Y, Factor VM, Thorgeirsson SS, Bell DW, Testa JR, et al. The Fn14 immediate-early response gene is induced during liver regeneration and highly expressed in both human and murine hepatocellular carcinomas. *Am J Pathol.* abril de 2000;156(4):1253-61.
93. Vince JE, Chau D, Callus B, Wong WW-L, Hawkins CJ, Schneider P, et al. TWEAK-FN14 signaling induces lysosomal degradation of a cIAP1-TRAF2 complex to sensitize tumor cells to TNF α . *J Cell Biol.* 14 de julio de 2008;182(1):171-84.
94. Wicovsky A, Salzmann S, Roos C, Ehrenschrwender M, Rosenthal T, Siegmund D, et al. TNF-like weak inducer of apoptosis inhibits proinflammatory TNF receptor-1 signaling. *Cell Death Differ.* noviembre de 2009;16(11):1445-59.
95. Nakayama M, Ishidoh K, Kayagaki N, Kojima Y, Yamaguchi N, Nakano H, et al. Multiple pathways of TWEAK-induced cell death. *J Immunol Baltim Md 1950.* 15 de enero de 2002;168(2):734-43.
96. Bover LC, Cardó-Vila M, Kuniyasu A, Sun J, Rangel R, Takeya M, et al. A previously unrecognized protein-protein interaction between TWEAK and CD163: potential biological implications. *J Immunol Baltim Md 1950.* 15 de junio de 2007;178(12):8183-94.
97. Moreno JA, Muñoz-García B, Martín-Ventura JL, Madrigal-Matute J, Orbe J, Páramo JA, et al. The CD163-expressing macrophages recognize and internalize TWEAK: potential consequences in atherosclerosis. *Atherosclerosis.* noviembre de 2009;207(1):103-10.
98. Brown SAN, Richards CM, Hanscom HN, Feng S-LY, Winkles JA. The Fn14 cytoplasmic tail binds tumour-necrosis-factor-receptor-associated factors 1, 2, 3 and 5 and mediates nuclear factor-kappaB activation. *Biochem J.* 15 de abril de 2003;371(Pt 2):395-403.
99. Brown SAN, Ghosh A, Winkles JA. Full-length, membrane-anchored TWEAK can function as a juxtacrine signaling molecule and activate the NF-kappaB pathway. *J Biol Chem.* 4 de junio de 2010;285(23):17432-41.
100. Moreno JA, Sastre C, Madrigal-Matute J, Muñoz-García B, Ortega L, Burkly LC, et al. HMGB1 expression and secretion are increased via TWEAK-Fn14 interaction in atherosclerotic plaques and cultured monocytes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* marzo de 2013;33(3):612-20.
101. Chapman MS, Wu L, Amatucci A, Ho SN, Michaelson JS. TWEAK signals through JAK-STAT to induce tumor cell apoptosis. *Cytokine.* enero de 2013;61(1):210-7.
102. Saitoh T, Nakayama M, Nakano H, Yagita H, Yamamoto N, Yamaoka S. TWEAK induces NF-kappaB2 p100 processing and long lasting NF-kappaB activation. *J Biol Chem.* 19 de septiembre de 2003;278(38):36005-12.
103. Muñoz-García B, Moreno JA, López-Franco O, Sanz AB, Martín-Ventura JL, Blanco J, et al. Tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis (TWEAK) enhances vascular and renal damage induced by hyperlipidemic diet in ApoE-knockout mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* diciembre de 2009;29(12):2061-8.
104. Damås JK, Smith C, Øie E, Fevang B, Halvorsen B, Waehre T, et al. Enhanced expression of the homeostatic chemokines CCL19 and CCL21 in clinical and experimental atherosclerosis: possible pathogenic role in plaque destabilization. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* marzo de 2007;27(3):614-20.

105. Donohue PJ, Richards CM, Brown SAN, Hanscom HN, Buschman J, Thangada S, et al. TWEAK is an endothelial cell growth and chemotactic factor that also potentiates FGF-2 and VEGF-A mitogenic activity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1 de abril de 2003;23(4):594-600.
106. Burkly LC, Michaelson JS, Zheng TS. TWEAK/Fn14 pathway: an immunological switch for shaping tissue responses. *Immunol Rev.* noviembre de 2011;244(1):99-114.
107. Hosokawa Y, Hosokawa I, Ozaki K, Nakae H, Matsuo T. Proinflammatory effects of tumour necrosis factor-like weak inducer of apoptosis (TWEAK) on human gingival fibroblasts. *Clin Exp Immunol.* diciembre de 2006;146(3):540-9.
108. Li H, Mittal A, Paul PK, Kumar M, Srivastava DS, Tyagi SC, et al. Tumor necrosis factor-related weak inducer of apoptosis augments matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) production in skeletal muscle through the activation of nuclear factor-kappaB-inducing kinase and p38 mitogen-activated protein kinase: a potential role of MMP-9 in myopathy. *J Biol Chem.* 13 de febrero de 2009;284(7):4439-50.
109. Sanz AB, Sanchez-Niño MD, Ramos AM, Moreno JA, Santamaria B, Ruiz-Ortega M, et al. NF-kappaB in renal inflammation. *J Am Soc Nephrol JASN.* agosto de 2010;21(8):1254-62.
110. Hayden MS, Ghosh S. Shared principles in NF-kappaB signaling. *Cell.* 8 de febrero de 2008;132(3):344-62.
111. Häcker H, Karin M. Regulation and function of IKK and IKK-related kinases. *Sci STKE Signal Transduct Knowl Environ.* 17 de octubre de 2006;2006(357):re13.
112. Kutuk O, Basaga H. Inflammation meets oxidation: NF-kappaB as a mediator of initial lesion development in atherosclerosis. *Trends Mol Med.* diciembre de 2003;9(12):549-57.
113. Chen F, Castranova V, Shi X, Demers LM. New insights into the role of nuclear factor-kappaB, a ubiquitous transcription factor in the initiation of diseases. *Clin Chem.* enero de 1999;45(1):7-17.
114. Handel ML, Girgis L. Transcription factors. *Best Pract Res Clin Rheumatol.* diciembre de 2001;15(5):657-75.
115. Neumann M, Naumann M. Beyond IkappaBs: alternative regulation of NF-kappaB activity. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol.* septiembre de 2007;21(11):2642-54.
116. Gerondakis S, Fulford TS, Messina NL, Grumont RJ. NF-kB control of T cell development. *Nat Immunol.* enero de 2014;15(1):15-25.
117. Martín-Ventura JL, Blanco-Colio LM, Muñoz-García B, Gómez-Hernández A, Arribas A, Ortega L, et al. NF-kappaB activation and Fas ligand overexpression in blood and plaques of patients with carotid atherosclerosis: potential implication in plaque instability. *Stroke J Cereb Circ.* febrero de 2004;35(2):458-63.
118. Ortiz-Muñoz G, Martín-Ventura JL, Hernández-Vargas P, Mallavia B, López-Parra V, López-Franco O, et al. Suppressors of cytokine signaling modulate JAK/STAT-mediated cell responses during atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* abril de 2009;29(4):525-31.
119. Darnell JE. STATs and gene regulation. *Science.* 12 de septiembre de 1997;277(5332):1630-5.

120. Shuai K, Liu B. Regulation of JAK-STAT signalling in the immune system. *Nat Rev Immunol*. noviembre de 2003;3(11):900-11.
121. Kiu H, Nicholson SE. Biology and significance of the JAK/STAT signalling pathways. *Growth Factors Chur Switz*. abril de 2012;30(2):88-106.
122. Pellegrini S, Dusanter-Fourt I. The structure, regulation and function of the Janus kinases (JAKs) and the signal transducers and activators of transcription (STATs). *Eur J Biochem FEBS*. 15 de septiembre de 1997;248(3):615-33.
123. Miklossy G, Hilliard TS, Turkson J. Therapeutic modulators of STAT signalling for human diseases. *Nat Rev Drug Discov*. agosto de 2013;12(8):611-29.
124. Stark GR, Darnell JE. The JAK-STAT pathway at twenty. *Immunity*. 20 de abril de 2012;36(4):503-14.
125. Leonard WJ, O'Shea JJ. Jaks and STATs: biological implications. *Annu Rev Immunol*. 1998;16:293-322.
126. Stark GR, Kerr IM, Williams BR, Silverman RH, Schreiber RD. How cells respond to interferons. *Annu Rev Biochem*. 1998;67:227-64.
127. Marrero MB, Banes-Berceli AK, Stern DM, Eaton DC. Role of the JAK/STAT signaling pathway in diabetic nephropathy. *Am J Physiol Renal Physiol*. abril de 2006;290(4):F762-768.
128. Mueller A, Strange PG. CCL3, acting via the chemokine receptor CCR5, leads to independent activation of Janus kinase 2 (JAK2) and Gi proteins. *FEBS Lett*. 16 de julio de 2004;570(1-3):126-32.
129. Ortiz-Muñoz G, Lopez-Parra V, Lopez-Franco O, Fernandez-Vizarra P, Mallavia B, Flores C, et al. Suppressors of cytokine signaling abrogate diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol JASN*. mayo de 2010;21(5):763-72.
130. Hernández-Vargas P, López-Franco O, Sanjuán G, Rupérez M, Ortiz-Muñoz G, Suzuki Y, et al. Suppressors of cytokine signaling regulate angiotensin II-activated Janus kinase-signal transducers and activators of transcription pathway in renal cells. *J Am Soc Nephrol JASN*. junio de 2005;16(6):1673-83.
131. Muñoz-García B, Martín-Ventura JL, Martínez E, Sánchez S, Hernández G, Ortega L, et al. Fn14 Is Upregulated in Cytokine-Stimulated Vascular Smooth Muscle Cells and Is Expressed in Human Carotid Atherosclerotic Plaques Modulation by Atorvastatin. *Stroke*. 8 de enero de 2006;37(8):2044-53.
132. Moreno JA, Dejouvencel T, Labreuche J, Smadja DM, Dussiot M, Martin-Ventura JL, et al. Peripheral artery disease is associated with a high CD163/TWEAK plasma ratio. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. junio de 2010;30(6):1253-62.
133. Martín-Ventura JL, Lindholt JS, Moreno JA, Vega de Céniga M, Meilhac O, Michel JB, et al. Soluble TWEAK plasma levels predict expansion of human abdominal aortic aneurysms. *Atherosclerosis*. febrero de 2011;214(2):486-9.
134. Maecker H, Varfolomeev E, Kischkel F, Lawrence D, LeBlanc H, Lee W, et al. TWEAK attenuates the transition from innate to adaptive immunity. *Cell*. 2 de diciembre de 2005;123(5):931-44.

135. Harada N, Nakayama M, Nakano H, Fukuchi Y, Yagita H, Okumura K. Pro-inflammatory effect of TWEAK/Fn14 interaction on human umbilical vein endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 6 de diciembre de 2002;299(3):488-93.
136. Lynch CN, Wang YC, Lund JK, Chen YW, Leal JA, Wiley SR. TWEAK induces angiogenesis and proliferation of endothelial cells. *J Biol Chem.* 26 de marzo de 1999;274(13):8455-9.
137. Han S, Yoon K, Lee K, Kim K, Jang H, Lee NK, et al. TNF-related weak inducer of apoptosis receptor, a TNF receptor superfamily member, activates NF-kappa B through TNF receptor-associated factors. *Biochem Biophys Res Commun.* 13 de junio de 2003;305(4):789-96.
138. Sastre C, Fernández-Laso V, Madrigal-Matute J, Muñoz-García B, Moreno JA, Pastor-Vargas C, et al. Genetic deletion or TWEAK blocking antibody administration reduce atherosclerosis and enhance plaque stability in mice. *J Cell Mol Med.* abril de 2014;18(4):721-34.
139. Ketelhuth DFJ, Bäck M. The role of matrix metalloproteinases in atherothrombosis. *Curr Atheroscler Rep.* abril de 2011;13(2):162-9.
140. Kim SH, Lee WH, Kwon BS, Oh GT, Choi YH, Park JE. Tumor necrosis factor receptor superfamily 12 may destabilize atherosclerotic plaques by inducing matrix metalloproteinases. *Jpn Circ J.* febrero de 2001;65(2):136-8.
141. Mackman N. Role of tissue factor in hemostasis and thrombosis. *Blood Cells Mol Dis.* abril de 2006;36(2):104-7.
142. Agirbasli M. Pivotal role of plasminogen-activator inhibitor 1 in vascular disease. *Int J Clin Pract.* enero de 2005;59(1):102-6.
143. Muñoz-García B, Madrigal-Matute J, Moreno JA, Martín-Ventura JL, López-Franco O, Sastre C, et al. TWEAK-Fn14 interaction enhances plasminogen activator inhibitor 1 and tissue factor expression in atherosclerotic plaques and in cultured vascular smooth muscle cells. *Cardiovasc Res.* 1 de enero de 2011;89(1):225-33.
144. Caligiuri G, Rossignol P, Julia P, Groyer E, Mouradian D, Urbain D, et al. Reduced immunoregulatory CD31+ T cells in patients with atherosclerotic abdominal aortic aneurysm. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* marzo de 2006;26(3):618-23.
145. Mallavia B, Oguiza A, Lopez-Franco O, Recio C, Ortiz-Muñoz G, Lazaro I, et al. Gene Deficiency in Activating Fcγ Receptors Influences the Macrophage Phenotypic Balance and Reduces Atherosclerosis in Mice. *PloS One.* 2013;8(6):e66754.
146. Dohi T, Borodovsky A, Wu P, Shearstone JR, Kawashima R, Runkel L, et al. TWEAK/Fn14 pathway: a nonredundant role in intestinal damage in mice through a TWEAK/intestinal epithelial cell axis. *Gastroenterology.* marzo de 2009;136(3):912-23.
147. Girgenrath M, Weng S, Kostek CA, Browning B, Wang M, Brown SAN, et al. TWEAK, via its receptor Fn14, is a novel regulator of mesenchymal progenitor cells and skeletal muscle regeneration. *EMBO J.* 13 de diciembre de 2006;25(24):5826-39.
148. Pyo R, Lee JK, Shipley JM, Curci JA, Mao D, Ziporin SJ, et al. Targeted gene disruption of matrix metalloproteinase-9 (gelatinase B) suppresses development of experimental abdominal aortic aneurysms. *J Clin Invest.* junio de 2000;105(11):1641-9.

149. Recio C, Oguiza A, Lazaro I, Mallavia B, Egidio J, Gomez-Guerrero C. Suppressor of cytokine signaling 1-derived peptide inhibits Janus kinase/signal transducers and activators of transcription pathway and improves inflammation and atherosclerosis in diabetic mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* septiembre de 2014;34(9):1953-60.
150. Sun J, Sukhova GK, Yang M, Wolters PJ, MacFarlane LA, Libby P, et al. Mast cells modulate the pathogenesis of elastase-induced abdominal aortic aneurysms in mice. *J Clin Invest.* noviembre de 2007;117(11):3359-68.
151. Hernández-Presa MA, Gómez-Guerrero C, Egidio J. In situ non-radioactive detection of nuclear factors in paraffin sections by Southwestern histochemistry. *Kidney Int.* enero de 1999;55(1):209-14.
152. Freestone T, Turner RJ, Coady A, Higman DJ, Greenhalgh RM, Powell JT. Inflammation and matrix metalloproteinases in the enlarging abdominal aortic aneurysm. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* agosto de 1995;15(8):1145-51.
153. Choke E, Thompson MM, Dawson J, Wilson WRW, Sayed S, Loftus IM, et al. Abdominal aortic aneurysm rupture is associated with increased medial neovascularization and overexpression of proangiogenic cytokines. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* septiembre de 2006;26(9):2077-82.
154. Houard X, Touat Z, Ollivier V, Louedec L, Philippe M, Sebbag U, et al. Mediators of neutrophil recruitment in human abdominal aortic aneurysms. *Cardiovasc Res.* 1 de junio de 2009;82(3):532-41.
155. Middleton RK, Bown MJ, Lloyd GM, Jones JL, London NJ, Sayers RD. Characterisation of Interleukin-8 and monocyte chemoattractant protein-1 expression within the abdominal aortic aneurysm and their association with mural inflammation. *Eur J Vasc Endovasc Surg Off J Eur Soc Vasc Surg.* enero de 2009;37(1):46-55.
156. López-Candales A, Holmes DR, Liao S, Scott MJ, Wickline SA, Thompson RW. Decreased vascular smooth muscle cell density in medial degeneration of human abdominal aortic aneurysms. *Am J Pathol.* marzo de 1997;150(3):993-1007.
157. Fontaine V, Touat Z, Mtairag EM, Vranckx R, Louedec L, Houard X, et al. Role of leukocyte elastase in preventing cellular re-colonization of the mural thrombus. *Am J Pathol.* junio de 2004;164(6):2077-87.
158. Satta J, Laurila A, Pääkkö P, Haukipuro K, Sormunen R, Parkkila S, et al. Chronic inflammation and elastin degradation in abdominal aortic aneurysm disease: an immunohistochemical and electron microscopic study. *Eur J Vasc Endovasc Surg Off J Eur Soc Vasc Surg.* abril de 1998;15(4):313-9.
159. Lopez-Parra V, Mallavia B, Lopez-Franco O, Ortiz-Muñoz G, Oguiza A, Recio C, et al. Fcγ receptor deficiency attenuates diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol JASN.* septiembre de 2012;23(9):1518-27.
160. Rekhter MD. How to evaluate plaque vulnerability in animal models of atherosclerosis? *Cardiovasc Res.* abril de 2002;54(1):36-41.
161. Stary HC, Chandler AB, Glagov S, Guyton JR, Insull W, Rosenfeld ME, et al. A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis. A report from the Committee on

- Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation*. mayo de 1994;89(5):2462-78.
162. Burkly LC, Dohi T. The TWEAK/Fn14 pathway in tissue remodeling: for better or for worse. *Adv Exp Med Biol*. 2011;691:305-22.
 163. Blanco-Colio LM, Martín-Ventura JL, Muñoz-García B, Orbe J, Páramo JA, Michel J-B, et al. Identification of soluble tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis (sTWEAK) as a possible biomarker of subclinical atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. abril de 2007;27(4):916-22.
 164. Schapira K, Burkly LC, Zheng TS, Wu P, Groeneweg M, Rousch M, et al. Fn14-Fc fusion protein regulates atherosclerosis in ApoE^{-/-} mice and inhibits macrophage lipid uptake in vitro. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. diciembre de 2009;29(12):2021-7.
 165. Haile WB, Echeverry R, Wu J, Yepes M. The interaction between tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis and its receptor fibroblast growth factor-inducible 14 promotes the recruitment of neutrophils into the ischemic brain. *J Cereb Blood Flow Metab Off J Int Soc Cereb Blood Flow Metab*. junio de 2010;30(6):1147-56.
 166. Kim S-H, Kang Y-J, Kim W-J, Woo D-K, Lee Y, Kim D-I, et al. TWEAK can induce pro-inflammatory cytokines and matrix metalloproteinase-9 in macrophages. *Circ J Off J Jpn Circ Soc*. abril de 2004;68(4):396-9.
 167. Iida Y, Xu B, Xuan H, Glover KJ, Tanaka H, Hu X, et al. Peptide inhibitor of CXCL4-CCL5 heterodimer formation, MKEY, inhibits experimental aortic aneurysm initiation and progression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. abril de 2013;33(4):718-26.
 168. Moehle CW, Bhamidipati CM, Alexander MR, Mehta GS, Irvine JN, Salmon M, et al. Bone marrow-derived MCP1 required for experimental aortic aneurysm formation and smooth muscle phenotypic modulation. *J Thorac Cardiovasc Surg*. diciembre de 2011;142(6):1567-74.
 169. Perper SJ, Browning B, Burkly LC, Weng S, Gao C, Giza K, et al. TWEAK is a novel arthritogenic mediator. *J Immunol Baltim Md 1950*. 15 de agosto de 2006;177(4):2610-20.
 170. Robbins CS, Hilgendorf I, Weber GF, Theurl I, Iwamoto Y, Figueiredo J-L, et al. Local proliferation dominates lesional macrophage accumulation in atherosclerosis. *Nat Med*. septiembre de 2013;19(9):1166-72.
 171. Dohi T, Burkly LC. The TWEAK/Fn14 pathway as an aggravating and perpetuating factor in inflammatory diseases: focus on inflammatory bowel diseases. *J Leukoc Biol*. agosto de 2012;92(2):265-79.
 172. Llauradó G, González-Clemente J-M, Maymó-Masip E, Subías D, Vendrell J, Chacón MR. Serum Levels of TWEAK and Scavenger Receptor CD163 in Type 1 Diabetes Mellitus: Relationship with Cardiovascular Risk Factors. A Case-Control Study. *PLoS ONE [Internet]*. 24 de agosto de 2012 [citado 18 de agosto de 2016];7(8). Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3427173/>
 173. Kralisch S, Ziegelmeier M, Bachmann A, Seeger J, Lössner U, Blüher M, et al. Serum levels of the atherosclerosis biomarker sTWEAK are decreased in type 2 diabetes and end-stage renal disease. *Atherosclerosis*. agosto de 2008;199(2):440-4.

174. Bennett G, Strissel KJ, DeFuria J, Wang J, Wu D, Burkly LC, et al. Deletion of TNF-Like Weak Inducer of Apoptosis (TWEAK) Protects Mice From Adipose and Systemic Impacts of Severe Obesity. *Obes Silver Spring Md.* junio de 2014;22(6):1485-94.
175. Sato S, Ogura Y, Tajrishi MM, Kumar A. Elevated levels of TWEAK in skeletal muscle promote visceral obesity, insulin resistance, and metabolic dysfunction. *FASEB J.* 3 de enero de 2015;29(3):988-1002.
176. Libby P, Theroux P. Pathophysiology of coronary artery disease. *Circulation.* 28 de junio de 2005;111(25):3481-8.
177. Getz GS, Reardon CA. Animal models of atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* mayo de 2012;32(5):1104-15.
178. Liu J, Ren Y, Kang L, Zhang L. Oxidized low-density lipoprotein increases the proliferation and migration of human coronary artery smooth muscle cells through the upregulation of osteopontin. *Int J Mol Med.* mayo de 2014;33(5):1341-7.
179. San Martin A, Foncea R, Laurindo FR, Ebensperger R, Griendling KK, Leighton F. Nox1-based NADPH oxidase-derived superoxide is required for VSMC activation by advanced glycation end-products. *Free Radic Biol Med.* 1 de junio de 2007;42(11):1671-9.
180. Chistiakov DA, Orekhov AN, Bobryshev YV. Vascular smooth muscle cell in atherosclerosis. *Acta Physiol Oxf Engl.* mayo de 2015;214(1):33-50.
181. Chen K-C, Wang Y-S, Hu C-Y, Chang W-C, Liao Y-C, Dai C-Y, et al. OxLDL up-regulates microRNA-29b, leading to epigenetic modifications of MMP-2/MMP-9 genes: a novel mechanism for cardiovascular diseases. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol.* mayo de 2011;25(5):1718-28.
182. Agrawal S, Febbraio M, Podrez E, Cathcart MK, Stark GR, Chisolm GM. Signal transducer and activator of transcription 1 is required for optimal foam cell formation and atherosclerotic lesion development. *Circulation.* 12 de junio de 2007;115(23):2939-47.
183. Gharavi NM, Alva JA, Mouillesseaux KP, Lai C, Yeh M, Yeung W, et al. Role of the Jak/STAT pathway in the regulation of interleukin-8 transcription by oxidized phospholipids in vitro and in atherosclerosis in vivo. *J Biol Chem.* 26 de octubre de 2007;282(43):31460-8.
184. Lim W-S, Timmins JM, Seimon TA, Sadler A, Kolodgie FD, Virmani R, et al. Signal transducer and activator of transcription-1 is critical for apoptosis in macrophages subjected to endoplasmic reticulum stress in vitro and in advanced atherosclerotic lesions in vivo. *Circulation.* 19 de febrero de 2008;117(7):940-51.
185. Marrero MB, Banes-Berceli AK, Stern DM, Eaton DC. Role of the JAK/STAT signaling pathway in diabetic nephropathy. *Am J Physiol Renal Physiol.* abril de 2006;290(4):F762-768.
186. Recio C, Oguiza A, Mallavia B, Lazaro I, Ortiz-Muñoz G, Lopez-Franco O, et al. Gene delivery of suppressors of cytokine signaling (SOCS) inhibits inflammation and atherosclerosis development in mice. *Basic Res Cardiol.* marzo de 2015;110(2):8.
187. Galluppi GR, Wisniacki N, Stebbins C. Population pharmacokinetic and pharmacodynamic analysis of BIIB023, an anti-TNF-like weak inducer of apoptosis (anti-TWEAK) monoclonal antibody. *Br J Clin Pharmacol.* julio de 2016;82(1):118-28.

188. Michaelson JS, Wisniacki N, Burkly LC, Putterman C. Role of TWEAK in lupus nephritis: a bench-to-bedside review. *J Autoimmun.* septiembre de 2012;39(3):130-42.
189. Wisniacki N, Amaravadi L, Galluppi GR, Zheng TS, Zhang R, Kong J, et al. Safety, tolerability, pharmacokinetics, and pharmacodynamics of anti-TWEAK monoclonal antibody in patients with rheumatoid arthritis. *Clin Ther.* agosto de 2013;35(8):1137-49.
190. A Study of RO5458640 in Patients With Advanced Solid Tumors - Full Text View - ClinicalTrials.gov [Internet]. [citado 23 de octubre de 2016]. Disponible en: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01383733?term=TWEAK+ANTIBODY&rank=2>
191. A Trial of PDL192 in Subjects With Advanced Solid Tumors - Full Text View - ClinicalTrials.gov [Internet]. [citado 23 de octubre de 2016]. Disponible en: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00738764?term=TWEAK+ANTIBODY&rank=4>
192. Lassen UN, Meulendijks D, Siu LL, Karanikas V, Mau-Sorensen M, Schellens JHM, et al. A phase I monotherapy study of RG7212, a first-in-class monoclonal antibody targeting TWEAK signaling in patients with advanced cancers. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 15 de enero de 2015;21(2):258-66.
193. Bowerman M, Salsac C, Coque E, Eiselt É, Deschaumes RG, Brodovitch A, et al. Tweak regulates astrogliosis, microgliosis and skeletal muscle atrophy in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Hum Mol Genet.* 15 de junio de 2015;24(12):3440-56.
194. Dohi T, Kawashima R, Kawamura YI, Otsubo T, Hagiwara T, Amatucci A, et al. Pathological activation of canonical nuclear-factor κ B by synergy of tumor necrosis factor α and TNF-like weak inducer of apoptosis in mouse acute colitis. *Cytokine.* septiembre de 2014;69(1):14-21.
195. Chen T, Guo Z-P, Fu L-X, Cao N, Qin S. Anti-TWEAK monoclonal antibodies reduce vascular damage and leucocyte infiltration in a mouse model of cutaneous reverse passive Arthus reaction. *Clin Exp Dermatol.* 18 de octubre de 2016;
196. Kamata K, Kamijo S, Nakajima A, Koyanagi A, Kurosawa H, Yagita H, et al. Involvement of TNF-like weak inducer of apoptosis in the pathogenesis of collagen-induced arthritis. *J Immunol Baltim Md 1950.* 1 de noviembre de 2006;177(9):6433-9.
197. Jarr K-U, Eschricht S, Burkly LC, Preusch M, Katus HA, Frey N, et al. TNF-Like Weak Inducer of Apoptosis Aggravates Left Ventricular Dysfunction after Myocardial Infarction in Mice. *Mediators Inflamm* [Internet]. 2014 [citado 24 de octubre de 2016];2014. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3945977/>
198. Potrovita I, Zhang W, Burkly L, Hahm K, Lincecum J, Wang MZ, et al. Tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis-induced neurodegeneration. *J Neurosci Off J Soc Neurosci.* 22 de septiembre de 2004;24(38):8237-44.
199. Sanz AB, Ruiz-Andres O, Sanchez-Niño MD, Ruiz-Ortega M, Ramos AM, Ortiz A. Out of the TWEAKlight: Elucidating the Role of Fn14 and TWEAK in Acute Kidney Injury. *Semin Nephrol.* mayo de 2016;36(3):189-98.
200. Yin X, Luistro L, Zhong H, Smith M, Nevins T, Schostack K, et al. RG7212 anti-TWEAK mAb inhibits tumor growth through inhibition of tumor cell proliferation and survival signaling and by enhancing the host antitumor immune response. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 15 de octubre de 2013;19(20):5686-98.

Bibliografía

201. Yadava RS, Foff EP, Yu Q, Gladman JT, Kim YK, Bhatt KS, et al. TWEAK/Fn14, a pathway and novel therapeutic target in myotonic dystrophy. *Hum Mol Genet.* 1 de abril de 2015;24(7):2035-48.

VIII.ANEXOS

Publicaciones derivadas de la tesis

Tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis or Fn14 deficiency reduce elastase perfusion-induced aortic abdominal aneurysm in mice.

Tarín C (1), Fernández-Laso V (1), Sastre C (1), Madrigal-Matute J (1), Gómez M (2), Zaragoza C (3), Egido J(1), Burkly LC(4), Martín-Ventura JL(1), Blanco-Colio LM(1).

J Am Heart Assoc. 2014 Aug 4;3(4). pii: e000723. doi: 10.1161/JAHA.113.000723.

Author information: (1) Vascular Research Lab, IIS-Fundación Jiménez Díaz, Madrid, Spain (C.T., V.F.L., C.S., J.M.M., J.E., J.L.M.V., L.M.B.C.). (2) Spanish National Cardiovascular Research Center, Madrid, Spain (, C.Z.). (3) Cardiovascular Joint Research Unit, University Hospital Ramón y Cajal Hospital and University Francisco de Vitoria School of Medicine, Madrid, Spain. (4) Biogen Idec, Cambridge, MA (L.C.B.).

BACKGROUND: Abdominal aortic aneurysm (AAA) involves leukocyte recruitment, inflammatory cytokine production, vascular cell apoptosis, neovascularization, and vascular remodeling, all of which contribute to aortic dilatation. Tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis (TWEAK) is a cytokine implicated in proinflammatory responses, angiogenesis, and matrix degradation but its role in AAA formation is currently unknown.

METHODS AND RESULTS: Experimental AAA with aortic elastase perfusion in mice was induced in wild-type (WT), TWEAK deficient (TWEAK KO), or Fn14-deficient (Fn14 KO) mice. TWEAK or Fn14 KO deficiency reduced aortic expansion, lesión macrophages, CD3(+) T cells, neutrophils, CD31(+) microvessels, CCL2 and CCL5 chemokines expression, and MMP activity after 14 days postperfusion. TWEAK and Fn14 KO mice also showed a reduced loss of medial vascular smooth muscle cells (VSMC) that was related to a reduced number of apoptotic cells in these animals compared with WT mice. Aortas from WT animals present a higher disruption of the elastic layer and MMP activity than those from TWEAK or Fn14 KO mice, indicating a Diminished vascular remodeling in KO animals. In vitro experiments unveiled that TWEAK induces CCL5 secretion and MMP-9 activation in both VSMC and bone marrow-derived macrophages, and decrease VSMC viability, effects dependent on Fn14.

CONCLUSIONS: TWEAK/Fn14 axis participates in AAA formation by promoting lesión inflammatory cell accumulation, angiogenesis, matrix-degrading protease expression, and vascular remodeling. Blocking TWEAK/Fn14 interaction could be a new target for the treatment of AAA.

© 2014 The Authors. Published on behalf of the American Heart Association, Inc.,

by Wiley Blackwell.

DOI: 10.1161/JAHA.113.000723

PMCID: PMC4310358

PMID: 25092786 [PubMed - indexed for MEDLINE]

TWEAK blockade decreases atherosclerotic lesion size and progression through suppression of STAT1 signaling in diabetic mice

Valvanera Fernández-Laso 1, Cristina Sastre 1*, Nerea Méndez-Barbero 1, Jesús Egido 1, Jose L. Martín-Ventura 1, Carmen Gómez-Guerrero 1, Luis M. Blanco-Colio 1†.*

1 Vascular Research Lab. FIIS-Fundación Jiménez Díaz. Av. Reyes Católicos 2, 28040, Madrid. Spain

* Both authors contribute equal to this work

† Corresponding author

Corresponding author: Luis M. Blanco-Colio Vascular Research Lab. FIIS-Fundación Jiménez Díaz. Av. Reyes Católicos 2, 28040, Madrid. Spain email: lblanco@fjd.es

(ACTUALMENTE EN REVISIÓN EN LA REVISTA CIENTÍFICA “SCIENTIFIC REPORTS”)

Abstract

Tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis (TWEAK/Tnfsf12) is a cytokine implicated in different steps associated with vascular remodeling. However, the role of TWEAK under hyperglycemic conditions is currently unknown. Using two different approaches, genetic deletion of Tnfsf12 and treatment with a TWEAK blocking mAb, we have analyzed the effect of TWEAK inhibition on atherosclerotic plaque progression and stability in streptozotocin-induced diabetic ApoE deficient mice. Genetic inactivation of Tnfsf12 reduced atherosclerosis extension and severity in diabetic ApoE deficient mice. Tnfsf12 deficient mice display a more stable plaque phenotype characterized by lower lipid and macrophage content within atherosclerotic plaques. A similar phenotype was observed in diabetic mice treated with anti-TWEAK mAb. The proatherosclerotic effects of TWEAK were mediated, at least in part, by STAT1 activation and expression of proinflammatory target genes (CCL5, CXCL10 and ICAM-1), both in plaques of ApoE mice and in cultured vascular smooth muscle cells (VSMCs) under hyperglycemic conditions. Loss-of-function experiments demonstrated that TWEAK induces proinflammatory genes mRNA expression through its receptor Fn14 and STAT1 activation in cultured VSMCs.

Overall, TWEAK blockade delay plaque progression and alter plaque composition in diabetic atherosclerotic mice. Therapies aimed to inhibit TWEAK expression and/or function could protect from diabetic vascular complications.

Otras publicaciones realizadas durante el desarrollo de la tesis

Soluble TWEAK and Major Adverse Cardiovascular Events in Patients with CKD.

Fernández-Laso V (1), **Sastre C** (1), **Valdivielso JM** (2), **Betriu A** (2), **Fernández E** (2), **Egido J** (1), **Martín-Ventura JL**(1), **Blanco-Colio LM**(3).

Clin J Am Soc Nephrol. 2016 Mar 7;11(3):413-22. doi: 10.2215/CJN.07900715. Epub 2016 Jan 4.

Author information: (1) Vascular Research Laboratory, Fundación Jiménez Díaz University Hospital-Health Research Institute, Madrid, Spain; and. (2) Unit for Detection and Treatment of Atherothrombotic Diseases, Experimental Nephrology Laboratory, Arnau de Vilanova University Hospital, Biomedical Research Institute of Lleida, Lleida, Spain. (3) Vascular Research Laboratory, Fundación Jiménez Díaz University Hospital-Health Research Institute, Madrid, Spain; and lblanco@fjd.es.

BACKGROUND AND OBJECTIVES: Soluble TNF-like weak inducer of apoptosis (sTWEAK) is a proinflammatory cytokine belonging to the TNF superfamily. sTWEAK concentrations have been associated with the presence of CKD and cardiovascular disease (CVD). We hypothesized that sTWEAK levels may relate to a higher prevalence of atherosclerotic plaques, vascular calcification, and cardiovascular outcomes observed in patients with CKD.

DESIGN, SETTING, PARTICIPANTS, & MEASUREMENTS: A 4-year prospective, multicenter, longitudinal study was conducted in 1058 patients with CKD stages 3-5D (mean age =58±13 years old; 665 men) but without any history of CVD from the NEFRONA Study (a study design on the prevalence of surrogate markers of CVD). Ankle-brachial index and B-mode ultrasound were performed to detect the presence of carotid and/or femoral atherosclerotic plaques together with biochemical measurements and sTWEAK assessment. Patients were followed for cardiovascular outcomes (follow-up of 3.13±1.15 years).

RESULTS: Patients with more advanced CKD had lower sTWEAK levels. sTWEAK concentrations were independently and negatively associated with carotid intima-media thickness. sTWEAK levels were lower in patients with carotid atherosclerotic plaques but not in those with femoral plaques. After adjustment by confounders, the odds ratio (OR) for presenting carotid atherosclerotic plaques in patients in the lowest versus highest tertile of sTWEAK was 4.18 (95% confidence interval [95% CI], 2.89 to 6.08; P<0.001). Furthermore, sTWEAK levels were lower in patients with calcified carotid atherosclerotic plaques. The OR for presenting calcified carotid plaques was 1.77 (95% CI, 1.06 to 2.93; P=0.02) after multivariable adjustment. After the follow-up, 41 fatal and 68 nonfatal cardiovascular events occurred. In a Cox model, after controlling for potential confounding factors, patients in the lowest tertile of sTWEAK concentrations had a higher risk of fatal and nonfatal cardiovascular events (hazard ratio [HR], 2.40; 95% CI, 1.33 to 4.33; P=0.004) and cardiovascular mortality (HR, 2.67; 95% CI, 1.05 to 6.76; P=0.04).

CONCLUSIONS: Low sTWEAK levels were associated with the presence of carotid Atherosclerotic plaques in patients with CKD. Additionally, lower sTWEAK levels were associated with a higher risk of cardiovascular morbidity and mortality.

Copyright © 2016 by the American Society of Nephrology.

DOI: 10.2215/CJN.07900715 PMCID: PMC4791813 [Available on 2017-03-07]

PMID: 26728587 [PubMed - indexed for MEDLINE]

TWEAK/Fn14 interaction promotes oxidative stress through NADPH oxidase activation in macrophages.

*Madrigal-Matute J (1), **Fernandez-Laso V** (2), Sastre C (2), Llamas-Granda P (2), Egido J(2), Martin-Ventura JL(2), Zalba G(3), Blanco-Colio LM(4).*

Cardiovasc Res. 2015 Oct 1;108(1):139-47. doi: 10.1093/cvr/cvv204. Epub 2015 Jul 29.

Author information: (1) Vascular Research Lab, IIS-Fundación Jiménez Díaz, Autonoma University, Av. Reyes Católicos 2, 28040 Madrid, Spain Department of Developmental and Molecular Biology, Albert Einstein College of Medicine, Bronx, NY, USA. (2) Vascular Research Lab, IIS-Fundación Jiménez Díaz, Autonoma University, Av. Reyes Católicos 2, 28040 Madrid, Spain. (3) Division of Cardiovascular Sciences, CIMA University of Navarra, Pamplona, Spain Department of Biochemistry and Genetics, University of Navarra, Pamplona, Spain. (4) Vascular Research Lab, IIS-Fundación Jiménez Díaz, Autonoma University, Av. Reyes Católicos 2, 28040 Madrid, Spain lblanco@fjd.es.

AIM: The interaction between TNF-like weak inducer of apoptosis (TWEAK, Tnfsf12) and the receptor, fibroblast growth factor-inducible 14 (Fn14), regulates vascular damage through different mechanisms, including inflammation. Oxidative stress plays a major role in inflammation and the development of atherosclerosis, but the relationship between TWEAK and oxidative stress is, however, poorly understood.

METHODS AND RESULTS: In this study, we found that TWEAK and Fn14 are co-localized with the NADPH subunits, p22phox and Nox2, in human advanced atherosclerotic plaques. Using primary human macrophages and a murine macrophage cell line, we demonstrate that TWEAK promotes ROS production and enhances NADPH oxidase activity. Hence, we show a direct involvement of the TWEAK-Fn14 axis in oxidative stress, as genetic silencing of Fn14 or Nox2 abrogates the TWEAK-induced ROS production. Furthermore, our results point at Rac1 as an upstream mediator of TWEAK during oxidative stress. Finally, using an in vivo murine model we confirmed the major role of TWEAK in oxidative stress, as genetic silencing of Tnfsf12 in an ApoE (-/-) background reduces the number of DHE and 8-hydroxydeoxyguanosine-positive macrophages by 50%.

CONCLUSIONS: Our results suggest that TWEAK regulates vascular damage by stimulating ROS production in an Nox2-dependent manner. These new insights into the TWEAK/Fn14 axis underline their potential use as therapeutic targets in atherosclerosis.

Published on behalf of the European Society of Cardiology. All rights reserved. © The Author 2015. For permissions please email: journals.permissions@oup.com.

DOI: 10.1093/cvr/cvv204

PMID: 26224570 [PubMed - indexed for MEDLINE]

Soluble TWEAK levels predict the presence of carotid atherosclerotic plaques in subjects free from clinical cardiovascular diseases.

Fernández-Laso V (1), Sastre C (1), Valdivielso JM (2), Fernández E (2), Martín-Ventura JL (1), Egido J (1), Blanco-Colio LM (3).

Atherosclerosis. 2015 Apr;239(2):358-63. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2015.01.040. Epub 2015 Feb 7.

Author information: (1) Vascular Research Lab, IIS- Fundación Jiménez Díaz, Madrid, Spain. (2) Unit for Detection and Treatment of Atherothrombotic Diseases, Experimental Nephrology Laboratory, Arnau de Vilanova University Hospital, IRBLLEIDA, Lleida, Spain. (3) Vascular Research Lab, IIS- Fundación Jiménez Díaz, Madrid, Spain. Electronic address: lblanco@fjd.es.

OBJECTIVE: Reduced soluble tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis (sTWEAK) levels have been related with cardiovascular disease. However, there are no data on the relationship between sTWEAK and atherosclerotic burden in subjects with or without cardiovascular risk factors but free from clinical disease. We have analyzed the association between circulating sTWEAK levels and the presence of carotid and/or femoral atherosclerotic plaques in subjects without known vascular disease.

METHODS: A multicenter, cross-sectional study was conducted in 448 subjects free from clinical CVD. B-mode ultrasound was performed to detect the presence of carotid and/or femoral atherosclerotic plaques. sTWEAK concentrations were measured by enzyme-linked immunosorbent assay.

RESULTS: sTWEAK serum levels were reduced in parallel with an increment in cardiovascular risk factors. sTWEAK concentrations were independently and negatively associated with carotid intima/media thickness. Subjects with atherosclerotic plaques showed a reduction in sTWEAK levels [808 (645-963) vs 993 (830-1278); $p < 0.001$]. A gradual decrease in sTWEAK levels was observed as the number of atherosclerotic plaques increased in our studied population. When we analyzed sTWEAK levels according to the vascular territory affected, we observed that sTWEAK concentrations were only diminished in subjects with carotid atherosclerotic plaques but not in those with femoral plaques. Following adjustment for various confounders, the OR for presenting carotid atherosclerotic plaque in subjects in lower vs higher tertile of sTWEAK levels was 8.09 [4.30-15.23; median (IQR); $p < 0.001$].

CONCLUSIONS: Diminished sTWEAK concentrations were significantly and independently associated with the presence of carotid atherosclerotic plaques in asymptomatic subjects.

Copyright © 2015 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2015.01.040

PMID: 25681674 [PubMed - indexed for MEDLINE]

[Atorvastatin inhibits the atherosclerotic lesion induced by tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis in apolipoprotein E deficient mice].

[Article in Spanish]

Fernández-Laso V (1), Sastre C (1), Egido J (1), Martín-Ventura JL (1), Blanco-Colio LM(2).

Clin Investig Arterioscler. 2015 Jan-Feb;27(1):17-25. doi: 10.1016/j.arteri.2014.04.003. Epub 2014 Jul 12.

Author information: (1) Laboratorio de Patología Vascular, Instituto de Investigación Sanitaria (ISS)-Fundación Jiménez Díaz, Madrid, España. (2) Laboratorio de Patología Vascular, Instituto de Investigación Sanitaria (ISS)-Fundación Jiménez Díaz, Madrid, España. Electronic address: lblanco@fjd.es.

AIM: Interaction of tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis (TWEAK) with its receptor Fn14 accelerates atherosclerotic plaque development in ApoE deficient mice (ApoE KO). In this work, an analysis has been made on the effect of an HMG-CoA reductase inhibitor, atorvastatin, on atherosclerotic plaque development accelerated by TWEAK in ApoE KO mice.

MATERIALS AND METHODS: Eight week-old ApoE KO mice were fed with a high cholesterol diet for 4 weeks. The animals were then randomized into 3 groups: mice injected i.p. with saline, recombinant TWEAK (10 µg/kg/twice a week), or recombinant TWEAK plus atorvastatin (1 mg/kg/day) for 4 weeks. The lesion size, cellular composition, lipid and collagen content were analyzed, as well as inflammatory response in atherosclerotic plaques present in aortic root of mice.

RESULTS: TWEAK treated mice showed an increase in atherosclerotic plaque size, as well as in collagen/lipid ratio compared with control mice. In addition, macrophage content, MCP-1 and RANTES expression, and NF-κB activation were augmented in atherosclerotic plaques present in aortic root of TWEAK treated mice compared with control mice. Treatment with atorvastatin prevented all these changes induced by TWEAK in atherosclerotic lesions. Atorvastatin treatment also decreased Fn14 expression in the atherosclerotic plaques of ApoE KO mice.

CONCLUSIONS: Atorvastatin prevents the pro-atherogenic effects induced by TWEAK in ApoE KO mice, which could be related to the inhibition of Fn14 expression. The results of this study provide new information on the beneficial effects of statin treatment in cardiovascular diseases.

Copyright © 2014 Sociedad Española de Arteriosclerosis. Published by Elsevier España. All rights reserved.

DOI: 10.1016/j.arteri.2014.04.003

PMID: 25027757 [PubMed - indexed for MEDLINE]

Genetic deletion or TWEAK blocking antibody administration reduce atherosclerosis and enhance plaque stability in mice.

Sastre C (1), **Fernández-Laso V**, Madrigal-Matute J, Muñoz-García B, Moreno JA, Pastor-Vargas C, Llamas-Granda P, Burkly LC, Egido J, Martín-Ventura JL, Blanco-Colio LM.

J Cell Mol Med. 2014 Apr;18(4):721-34. doi: 10.1111/jcmm.12221. Epub 2014 Jan 30.

Author information: (1) Lab. Patología Vascular, IIS-Fundación Jiménez Díaz, Madrid, Spain.

Clinical complications associated with atherosclerotic plaques arise from luminal obstruction due to plaque growth or destabilization leading to rupture. Tumour necrosis factor ligand superfamily member 12 (TNFSF12) also known as TNF-related Tweak inducer of apoptosis (TWEAK) is a proinflammatory cytokine that participates in atherosclerotic plaque development, but its role in plaque stability remains unclear. Using two different approaches, genetic deletion of TNFSF12 and treatment with a TWEAK blocking mAb in atherosclerosis-prone mice, we have analysed the effect of TWEAK inhibition on atherosclerotic plaques progression and stability. Mice lacking both TNFSF12 and Apolipoprotein E (TNFSF12(-/-) ApoE (-/-)) exhibited a diminished atherosclerotic burden and lesion size in their aorta. Advanced atherosclerotic plaques of TNFSF12(-/-) ApoE (-/-) or anti-TWEAK treated mice exhibited an increase collagen/lipid and vascular smooth muscle cell/macrophage ratios compared with TNFSF12(+/+) ApoE (-/-) control mice, reflecting a more stable plaque phenotype. These changes are related with two different mechanisms, reduction of the inflammatory response (chemokines expression and secretion and nuclear factor kappa B activation) and decrease of metalloproteinase activity in atherosclerotic plaques of TNFSF12(-/-) ApoE (-/-). A similar phenotype was observed with anti-TWEAK mAb treatment in TNFSF12(+/+) ApoE (-/-) mice. Brachiocephalic arteries were also examined since they exhibit additional features akin to human atherosclerotic plaques associated with instability and rupture. Features of greater plaque stability including augmented collagen/lipid ratio, reduced macrophage content, and less presence of lateral xanthomas, buried caps, medial erosion, intraplaque haemorrhage and calcium content were present in TNFSF12(-/-) ApoE (-/-) or anti-TWEAK treatment in TNFSF12(+/+) ApoE (-/-) mice. Overall, our data indicate that anti-TWEAK treatment has the capacity to diminish proinflammatory response associated with atherosclerotic plaque progression and to alter plaque morphology towards a stable phenotype.

© 2014 The Authors. Journal of Cellular and Molecular Medicine published by John

Wiley & Sons Ltd and Foundation for Cellular and Molecular Medicine.

DOI: 10.1111/jcmm.12221

PMCID: PMC4000122

PMID: 24479820 [PubMed - indexed for MEDLINE]